UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES de MARSEILLE

N° D'ORDRE : 28

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

Faculté des Sciences de Marseille

POUR L'OBTENTION DU

GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Marcel MOURGUE

CHARGÉ DE RECHERCHES DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

1re Thèse : **Contribution à la biochimie de la leucine et de la valine.**

2me Thèse : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le 14 Mars 1944, devant la Commission d'examen

MM. G. PETIT, *Président.*
J. ROCHE,
G. MORIN, } *Examinateurs.*
P. DESNUELLE,

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1944

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES de MARSEILLE

N° D'ORDRE : 28

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

Faculté des Sciences de Marseille

POUR L'OBTENTION DU

GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Marcel MOURGUE

CHARGÉ DE RECHERCHES DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

1re Thèse : **Contribution à la biochimie de la leucine et de la valine.**

2me Thèse : **Propositions données par la Faculté**

Soutenues le Mars 1944, devant la Commission d'examen

MM. G. PETIT, *Président.*
J. ROCHE,
G. MORIN, } *Examinateurs.*
P. DESNUELLE,

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1944

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Mort au Champ d'Honneur :
M. Fr. MARTY,
Maître de Conférences de Mathématiques
(14 juin 1940)

Doyen et Professeur honoraire :
M. MARCHAUD

Professeurs honoraires :
MM. M. CAULLERY, Ch. FABRY, E. FABRY, J. PERES,
L. HOULLEVIGUE, J. COTTE, E. DECROCK, H. BIERRY.

Doyen : M. G. CORROY ; **Assesseur :** M. A. TIAN ;
Secrétaire : M. A. CASTELLA

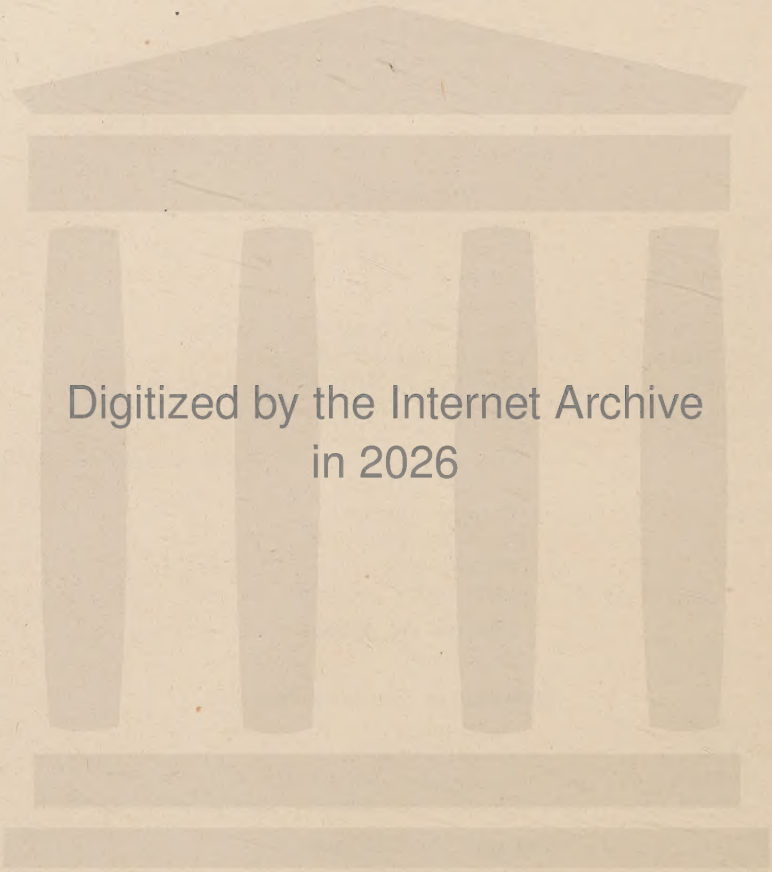
MM.	**Professeurs :**
P. SEVE	Physique industrielle
A. TIAN	Chimie générale
M. KOLLMANN	Zoologie générale
J. BOSLER	Astronomie
E. TRAYNARD	Calcul différentiel et intégral
L. MARGAILLAN	Chimie industrielle
G. CORROY	Géologie et Minéralogie
P. CHOUX	Botanique générale
E. RAYMOND	Chimie P. C. B.
R. THIRY	Mécanique rationnelle et Mécanique des fluides
G. PETIT	Biologie animale
H. PRAT	Biologie végétale
N.....	Physique générale
N.....	Physiologie
N.....	Agronomie coloniale
	Chargé de Cours :
M. G. MORIN.....	Physiologie

MM.	**Maîtres de Conférences :**
C. JAUSSERAN	Physique P. C. B.
ROGER (1)	Mathématiques
L. SACKMANN	Mécanique des fluides
P. DESNUELLE	Chimie biologique et Corps gras

MM.	**Chargés de Conférences :**
Cᵗ ROUCH	Océanographie
J. ROCHE	Chimie biologique
G. DENIZOT	Géographie physique et Géologie appliquée
E. CALVET	Chimie
J. TIMON-DAVID	Zoologie agricole
A. FAVRE	Météorologie
G. MALCUIT	Botanique appliquée

Maîtres de Conférences honoraires :
MM. E. MEISSONNIER, L. LAURENT, H. BIMAR, D. RICARD.

(1) *Prisonnier de guerre. Suppléé par M. E. BLANC*


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547003_0065

AVANT-PROPOS.

Avant d'aborder le sujet de ce travail, je tiens à exprimer mon entière reconnaissance et mon inaltérable dévouement à M. le Professeur J. ROCHE, dont l'esprit de recherche a eu sur mon orientation une influence prépondérante pendant les dix années passées à ses côtés dans le laboratoire Andrée ROCHE.

La bienveillance avec laquelle M. le Professeur C. FROMAGEOT m'a accueilli dans son service et avec laquelle il m'a dirigé dans la première partie de ce travail me font un devoir de lui témoigner ici ma gratitude.

M. le Professeur G. Petit, naturaliste de terrain et homme de laboratoire voué aux Sciences naturelles et aux Sciences biologiques, a bien voulu me faire l'honneur d'accepter la présidence de cette Thèse. Je lui en exprime ma reconnaissance ainsi qu'à M. le Professeur G. MORIN et à M. P. DESNUELLE, Maître de Conférence de Chimie biologique, membres du Jury.

Et que mon Père, Maître de la première heure auquel je dois l'amour de la Science, me permette de lui dédier ce travail comme je le dédie à mes Maîtres de l'Université.

INTRODUCTION.

EXPOSÉ DES TRAVAUX ANTÉRIEURS ET OBJET DU TRAVAIL.

La valine et la leucine sont des acides monoaminés monocarboxyliques difficiles à doser spécifiquement, étant donnée leur grande analogie de structure. Toutefois, l'existence dans ces deux amino-acides homologues, l'un en C_5, l'autre en C_6, d'un groupement isopropylique $(CH_3)_2$: CH- donnant naissance à de l'acétone au cours de fermentations diverses, devait inciter les chercheurs à trouver une méthode de dosage basée sur l'oxydation de celui-ci. Une telle méthode permettrait par la suite de poursuivre l'étude simultanée, comparative, de la teneur en leucine et en valine de protéines appartenant à diverses classes, ce qui n'a pas été fait d'une manière systématique jusqu'à présent, faute de moyens d'investigation convenables. Si nous possédons de nombreuses données, assez imprécises d'ailleurs, sur les taux de leucine dans des protéines, celles propres à la valine sont plus rares et tout aussi incertaines. Etant donnée l'importance de leur taux dans certaines protéines et l'universalité de répartition de ces corps en tant qu'acides aminés indispensables à la croissance, nous nous sommes proposés :

1° de mettre au point leur dosage ;

2° de les doser dans diverses protéines ;

3° d'étudier leur mise en liberté au cours de l'hydrolyse chimique ou enzymatique des protéines afin de chercher à préciser leur position dans la molécule de celles-ci.

Avant d'exposer nos recherches, il convient de résumer les travaux antérieurs afin d'en dégager ce qui pouvait en être retenu et de préciser leurs lacunes.

CONSTITUTION ET PROPRIÉTÉS DE LA LEUCINE ET DE LA VALINE.

A. — **Leucine :** $(CH_3)_2CH - CH_2 - CH(NH_2) - COOH$

La leucine a été découverte en 1818 par PROUST [**129, 171, 5**] qui la désigna sous le nom d'oxyde caséeux. Deux ans plus tard, BRACONNOT [**35**] l'obtint à partir de l'hydrolyse acide de la chair de bœuf et lui donna le nom sous lequel nous la connaissons ; il conclut de plus à l'identité de l'oxyde caséeux de PROUST et de l'aposépédine qu'il isola du fromage [**36**], sans voir que leucine, oxyde caséeux et aposépédine constituent un seul et même corps, leur identité ne devant être démontrée que beaucoup plus tard (1848) par CAHOURS [**42**]. La composition centésimale, fixée d'abord par MULDER [**112, 113**] et par CAHOURS [**42**] comme correspondant à la formule $C_6H_{12}O_2N$, fut modifiée, par LAURENT et GERHARDT [**95**] qui trouvèrent un atome d'hydrogène en plus, soit $C_6H_{13}O_2N$.

a) ETAT NATUREL. — Cet acide aminé entre dans la constitution d'un grand nombre de protéines animales ou végétales. Il n'est pas de protéine qui ne contienne de la leucine. On en trouve également à l'état libre dans la nature. Certains auteurs se sont contentés de la caractériser, d'autres l'ont dosée. E. SCHULZE [**150, 151, 152, 149**] l'a isolée des bourgeons de Vesce (*Vicia sativa*), des graines de Soja (*Soja hispida*). On on trouve dans le Lupin blanc, le Lupin jaune et le Petit-Pois (ABDERHALDEN [**5**]). SHOREY [**156**] l'a caractérisée dans la canne à sucre, à côté du glycocolle. Il en existe dans la Renoncule aquatique, les bourgeons de *Chenopodium*, dans la rate, le pancréas, la lymphe, parfois dans l'urine (MOREIGNE [**107**]). L'autolyse de la levure donne naissance à cet acide aminé (MEISENHEIMER [**103**]).

Par ailleurs, l'hydrolyse acide, alcaline ou enzymatique libère de la *l*-leucine à partir de toutes les protéines. Rappelons quelques travaux relatifs à ces actions, puisque, comme on le verra plus loin, il nous a semblé utile de reprendre l'étude de la libération de la leucine et de la valine au cours de l'hydrolyse chimique et enzymatique.

1. *Par voie chimique.* — De la leucine a été obtenue par divers auteurs à partir de la caséine (R. Cohn [46], E. Fischer [59] et Engeland [53]), de l'oxyhémoglobine (Prœscher [128], Fischer et Abderhalden [62]), des albumines d'os de Bœuf (Etard [55]), de la fibroïne (Fischer et Aladar Skita [65]), de la gélatine (Fischer, Levene et Aders [64], Skraup [158]), de l'édestine (Abderhalden [2]), de la zéine (Langstein [94]) et enfin de diverses protéines (Kutscher [90], Erlenmeyer et Schoeffer [54], Schwanert [155]).

2. *Par voie enzymatique.* — La pepsine agissant sur la caséine (Lubavin [102]), l'oxyhémoglobine de Cheval et la globine (Salaskin [145]), les albumines coagulées du sérum sanguin (Langstein [93]), libère de la leucine.

La papaïne agissant sur la fibrine (Emmerling [52], Kutscher et Lohmann [91], Bergmann et Niemann [33]) a permis à ces auteurs de mettre en évidence la présence de leucine libre après plusieurs semaines de protéolyse.

Enfin, l'action de la trypsine (mélange d'enzymes du suc pancréatique ou des extraits de pancréas) sur la caséine (Röhmann [141], Frankel, Gallia, Liebster et Rosen [69]), l'oxyhémoglobine (Salaskin [145]), diverses protéines (Kutscher et Seemmann [92]), la fibrine (Cohn [45]), la gélatine (Reich-Herzberger [131]), l'édestine (Abderhalden et Reinbold [14]) libère des quantités plus ou moins importantes de leucine.

b) Constitution. — La formule développée, définitive, fut donnée par E. Schulze et A. Likiernik [154], qui font de la leucine l'acide α-amino-isobutyl-acétique. Il s'agit donc d'un acide α-aminé monocarboxylique, homologue supérieur de la valine, ces deux acides aminés étant caractérisés par la présence d'un groupement isopropylique.

Son poids moléculaire est égal à 131,11 et il existe trois isomères de constitution ayant ce même poids moléculaire : la leucine, l'isoleucine et la norleucine et, pour chacun d'eux, trois isomères optiques (*d*, *l* et *dl*). La *l*-leucine est la forme naturelle.

c) Propriétés physiques. — Petites lamelles incolores, brillantes, grasses au toucher, faiblement amères. Par chauffage lent elles se subliment sans fondre ; leur point de fusion varie de 293° à 295° suivant les auteurs ; solubles à raison de 1

partie dans 41 parties d'eau à 22°, leur pouvoir rotatoire en solution aqueuse est égal : $[\alpha]_D^{20} = -10°35$.

d) Propriétés chimiques. — Comme tous les acides aminés la leucine est susceptible de fournir des combinaisons grâce d'une part à sa fonction acide et d'autre part à sa fonction basique. Comme ces combinaisons (sels, éthers-sels, peptides) très nombreuses n'offrent pour nous qu'un intérêt relatif, nous nous bornerons à rappeler que les divers isomères optiques peuvent donner naissance à un sel de suivre bien défini, cristallisé, presque insoluble dans l'eau et l'alcool méthylique. Le sel de cuivre de la *l*-leucine est soluble dans l'eau à raison de 1 partie dans 3045 parties d'eau froide et 1460 parties d'eau chaude ; ce même sel est insoluble dans l'alcool méthylique. Nous verrons, plus loin, l'utilité de ce sel pour la séparation et le dosage de la *l*-leucine dans des hydrolysats protéiques.

Signalons que le sel de cuivre de la *d*-isoleucine est soluble dans l'eau (278 parties à 17°), dans l'alcool méthylique (55 parties à 17°) et dans l'alcool éthylique (476 parties à 17°). Ce fait est à retenir au moment de la séparation de la *l*-leucine, car la *d*-isoleucine naturelle accompagne très souvent la *l*-leucine dans les matières protéiques.

Elle fournit, avec l'hydrate de tricetohydrindène (ninhydrine), une coloration bleue sensible au 1/25.000e (Abderhalden et Hubert Schmidt [18]), mais c'est là une réaction commune à presque tous les acides aminés. Une autre réaction colorée est donnée en présence de phénol et d'hypochlorite de sodium (Thomas [165]) ; elle est due au groupement $-NH_2$, donc peu caractéristique de la leucine.

Parmi tous les dérivés donnés par la leucine les esters éthyliques sont importants ; en effet, pour doser la leucine et la valine suivant la technique décrite par E. Fischer, on a recours à l'estérification de ces acides aminés et à la distillation des esters. En décrivant cette technique, nous donnerons les points d'ébullition des esters de la leucine à diverses pressions.

L'hydrolyse alcaline des protéines aboutit toujours à la racémisation de la *l*-leucine qu'elles contiennent. E. Schulze et E. Bosshard [153], les premiers qui se sont occupés de cette racémisation, utilisent l'eau de baryte à 160° et réalisent leurs essais sur la conglutine dont ils arrivent à isoler 14,6

p. 100 de leucine. Le bioxyde de plomb, en milieu aqueux, à 160°, réalise la même transformation (Fischer [58]).

Kögl et Erxleben [86] étudiant la composition chimique de diverses tumeurs isolent de la *d*-leucine (4,9 p. 100) et de la *d*-valine (1,7 p. 100). Quant à la *d*-leucine, elle se forme à partir de de la *dl*-leucine mise en présence de *Penicillum glaucum* ou de levures, le dérivé *l* étant métabolisé préférentiellement (Pringsheim [127]).

B. — **Valine :** $(CH_3)_2CH - CH(NH_2) - COOH$

La valine a été découverte par Gorup-Besanez [74] dans le pancréas du Bœuf.

a) Etat naturel. — On la trouve à l'état naturel généralement dans les mêmes organes animaux ou végétaux que la *l*-leucine : dans les bourgeons de Vesce, de Lupin, dans le Haricot, dans divers fromages (Abderhalden [5]). On met en liberté de la *d*-valine toutes les fois qu'on hydrolyse des protéines par voie chimique. Il s'en forme par autolyse de l'estomac, du pancréas et du foie.

Rappelons quelques travaux portant sur la libération de cet acide aminé par hydrolyse acide, alcaline ou enzymatique.

1. *Par voie chimique.* — De la valine a pu être isolée à partir de diverses protéines. Parmi ces dernières nous citerons : les protamines, dont la salmine, la clupéine et la cyprinine (Alderhalden [7], Kossel et Dakin [88], Kossel [87]), l'édestine (Alderhalden [3], Alderhalden et Rostoski [15], les protéines des graines de Lupin (Alderhalden et Herrick [8], les protéines des graines de Pin (Alderhalden et Teruuchi [20]), la caséine (Fischer [59], Engeland [53]), et la pepsine (Morel et Hugounenq [109]).

2. *Par voie enzymatique.* — La papaïne agissant sur la fibrine libère de la valine (Kutscher et Lohmann [91]). La trypsine met également en liberté de la valine quand on la fait agir sur la caséine (Frankel, Gallia, Liebster et Rosen [69]).

b) Constitution. — La constitution de la valine en fait l'homologue inférieur de la leucine. C'est l'acide α-aminoisopropylacétique. Son poids moléculaire est de 117,10 et il existe deux isomères de constitution ayant ce poids molécu-

laire : la valine et la norvaline, cette dernière étant l'acide α-amino-valérianique. Chacun d'eux possède un atome de carbone asymétrique et il existe les formes *l*, *d* et *dl*, la *d*-valine étant celle qu'on trouve à l'état naturel. Sa constitution a été établie en 1906 par Fischer [61].

c) Propriétés physiques. — La *d*-valine se présente en petits cristaux blancs, brillants, lamellaires rappelant beaucoup ceux de la *l*-leucine, de saveur d'abord douce ensuite amère, solubles à raison de 1 partie dans 11 parties d'eau à 16°5, donc plus solubles que ceux de *l*-leucine, insolubles dans l'éther. Leur point de fusion est de 315°, leur pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{20^\circ} = + 6°42$, dans l'eau.

d) Propriétés chimiques. — Tout comme la leucine, la valine fournit une coloration bleue sensible au 1/15.000e en présence de tricetohydrindène (ninhydrine).

Parmi les nombreuses combinaisons que peut donner la valine nous ne retiendrons que le sel de cuivre et l'ester éthylique, tous deux utilisés pour la séparation et le dosage de cet acide aminé. Le premier est soluble dans l'eau et dans l'alcool méthylique (52 parties d'alcool méthylique à 18°), insoluble dans l'alcool éthylique. Quant à l'ester éthylique qui trouve son application dans la méthode de Fischer, il bout entre 50° et 80° sous une pression inférieure à 15 mm.Hg.

DOSAGE DE LA LEUCINE ET DE LA VALINE DANS LES PROTÉINES.

I. — Méthodes.

Les méthodes classiques de dosage de la leucine et de la valine ne sont pas nombreuses et il n'en existe pas de spécifique. Nous énumérerons successivement celle de E. Fischer, celle de Levene, Beatty et van Slyke, celle de Brazier et enfin celle de Dakin et la technique d'isolement proposée par Barnett.

Une méthode récente basée sur la transformation en acétone du groupement isopropyplique de la leucine et de la valine permet de doser ces corps dans leur mélange. Comme cette méthode sert de base à celle que nous proposons pour le dosage de la leucine et de la valine dans les protéines, sa description sera donnée dans un prochain chapitre.

Méthode de E. Fischer [59, 60]. — Elle utilise la formation d'esters éthyliques qu'on distille sous pression réduite de façon à recueillir des fractions bien déterminées, la libération des acides aminés de leurs combinaisons éthyliques et leur passage à l'état de sels de cuivre. On met finalement à profit la différence de solubilité dans l'alcool méthylique qui existe entre ces sels pour les séparer et opérer une purification des acides libres par cristallisation fractionnée. Il est ensuite indispensable de procéder à l'analyse élémentaire de chaque fraction et de déterminer le pouvoir rotatoire des produits obtenus.

Voici un résumé des temps principaux de cette très longue opération :

1° Hydrolyser la protéine par HCl.

2° Séparer les acides aminés en deux groupes par action du réactif phosphotungstique : ceux qui sont entraînés par le réactif (lysine, ornithine, arginine, histidine et un peu de cystine) et ceux qui restent en solution (tous les autres acides aminés y compris, par conséquent, la leucine et la valine).

3° Eliminer des eaux-mères l'excès de réactif phosphotungstique et d'acide sulfurique, par la baryte.

4° Concentrer la solution, ce qui laisse déposer : tyrosine, leucine, alanine et valine par couches successives, chacune d'elles étant en réalité constituée par un mélange. Le premier dépôt est riche en tyrosine, le second surtout en leucine.

5° Formation des esters en reprenant les acides aminés par de l'alcool absolu et en faisant passer dans le milieu un courant de HCl gazeux.

6° Extraction des esters éthyliques par l'éther ordinaire.

7° Fractionnement des esters. On distille dans le vide partiel en chauffant au bain-marie pour les premières fractions. Le vide doit être inférieur à 15 mm., les températures doivent être prises dans le bain-marie. Pour les 5e et 6e fractions le bain-marie est remplacé par un bain d'huile. On isole ainsi sept fractions :

1re fraction (< 46°) : esters du glycocolle et de l'alanine.

2e fraction (46°-55°) : esters du glycocolle, de l'alanine et de la valine.

3e (55°-80°) : esters de l'alanine, de la valine, de la leucine et de la proline.

4e fraction (80°-100°) : esters de l'alanine, de la valine, de la leucine, de la proline et de la sérine.

5e fraction (100°-110°) : idem.

6e fraction : (110°-160°) : esters de la sérine, de la phénylalanine, de l'acide glutamique et de l'acide aspartique.

7e fraction : résidu.

Pour préciser nous ajouterons que l'ester de la *l*-leucine bout à 83°5, sous 12 mm. Hg. de pression, à 88° sous 18 mm. et à 196° sous 761 mm.

8° Libération des acides aminés de leurs combinaisons.

9° Purification des acides aminés. Elle se fait par cristallisation fractionnée répétée, en s'aidant du pouvoir rotatoire ou en dosant l'azote dans le produit obtenu. La teneur en azote de la valine doit tendre vers 11,9 p. 100, celle de la leucine vers 10,68 p. 100.

La méthode de E. Fischer n'est pas à l'abri de toute critique : « La technique que nous venons d'indiquer, malgré sa longueur, ne permet pas d'arriver d'emblée à des produits purs ; chaque produit ainsi isolé est un mélange qu'il faut fractionner et purifier. Il faut donc reprendre chacun de ces mélanges l'un après l'autre. Malgré tout cela, la leucine est si difficile à obtenir absolument pure que Fischer ne craint pas de dire que tous les dosages de leucine publiés dans son Institut se rapportent à des mélanges de *l*-leucine, d'isoleucine et de valine » (Morel [108]).

« La valine se trouve, en utilisant la méthode de Fischer, avec la leucine et un peu d'isoleucine dans la fraction des esters qui bout entre 80° et 90° sous pression réduite. Quand de petites quantités sont présentes la séparation de la valine n'est pas possible. Souvent, la cristallisation fractionnée des acides aminés obtenus à partir des esters amène des pertes à la séparation » (Abderhalden [5]).

D'autres critiques ont été adressées à cette méthode, en particulier par Osborne et Jones [122]. Ces auteurs, au lieu de partir d'une protéine, s'adressent à un mélange de douze acides aminés purs dont les quantités mises en œuvre sont connues et leur appliquent la méthode de Fischer. Sans reproduire le tableau complet dressé par Osborne et Jones nous en extrayons cependant les quelques valeurs suivantes :

	Acide aminé utilisé	Retrouvé	Pour cent
	—	—	—
Valine.....	4,00 g.	1,64 g.	41,00
Leucine.....	85,00 g.	69,36 g.	81,60

Ces valeurs parlent d'elles-mêmes. Fischer avait institué sa méthode en vue de séparer des acides aminés, dont quelques-uns seulement étaient connus en 1901, et de les identifier. C'était, par conséquent, une technique permettant une séparation qualitative et non quantitative, bien que quelques chercheurs en aient fait une méthode de dosage. D'après Schmidt [147] on doit attribuer les pertes à diverses causes : estérification incomplète, hydrolyse partielle des esters avant leur distillation, pertes inévitables au cours de la cristallisation

fractionnée, transformation des esters en dicetopiperazines et enfin décomposition pendant que s'opère la distillation.

Dans le but de rendre cette méthode plus précise, certains auteurs ont préconisé la formation de sels de cuivre, en utilisant l'insolubilité du sel de cuivre de la leucine dans l'alcool méthylique, dans lequel les sels de cuivre de la *d*-valine et de la *d*-isoleucine sont solubles. « La détermination quantitative exacte du contenu d'un corps albuminoïde en *l*-leucine présente des difficultés car aucun ester, à l'état pur, ne peut être retiré au moyen du fractionnement. On retire des mélanges d'esters de *l*-leucine, *d*-isoleucine et *d*-valine. Les esters sont saponifiés et la séparation des acides aminés a lieu par cristallisation fractionnée » (Abderhalden [5]).

Chacune des fractions (qui est en réalité un mélange de deux ou trois acides aminés avec prédominance de celui qu'on veut isoler) est amenée à l'état de sel de cuivre ; par action de l'alcool méthylique on sépare le sel de cuivre insoluble de la *l*-leucine. Par chauffage à 130° en présence d'eau de baryte on racémise la *d*-valine et la *d*-isoleucine et, après avoir éliminé la baryte, on forme les sels de cuivre de la *dl*-valine et de la *d*-alloisoleucine. Il suffit de traiter ce mélange par l'alcool éthylique pour dissoudre uniquement ce dernier.

D'après Fischer [60], si l'on ne cherche pas à isoler les acides aminés sous leurs formes optiquement actives et si l'on veut surtout séparer la leucine on a intérêt à racémiser leur mélange par chauffage avec de l'eau de baryte pendant vingt-quatre heures, à éliminer la baryte et à concentrer, ce qui laisse déposer la *dl*-leucine en premier lieu ; on isole cette leucine et on la purifie.

Méthode de Levene, Beatty et van Slyke [97, 98, 99].

S'il s'agit de séparer la *d*-valine de la somme : *l*-leucine + *d*-isoleucine on peut utiliser la méthode à l'acétate de plomb ammoniacal préconisée par Levene et Beatty [**97**], Levene et van Slyke [**99**]. Cette méthode consiste à ajouter une solution ammoniacale d'acétate de plomb à la solution des trois acides aminés considérés. Seul, le sel de plomb de la *d*-valine est soluble. Par la suite, on sépare la *l*-leucine de la *d*-isoleucine en formant les sels de cuivre, dont seul celui de la seconde est soluble dans l'alcool méthylique. Une fois les sels de cuivre isolés (ceci s'applique également à la méthode de E. Fischer) il s'agit de régénérer les acides aminés à l'état pur et de les identifier en se basant sur leurs propriétés physiques et chimiques.

D'après Levene et van Slyke [98], cette méthode appliquée à la caséine a permis d'isoler : 7,92 p. 100 de *l*-leucine, 1,43 p. 100 de *d*-isoleucine et 0,69 p. 100 de *d*-valine. Appliquée à la peptone de Witte elle a permis d'y doser la *l*-leucine et la *d*-valine (dont la somme = 14,70 p. 100), et, mise en œuvre sur la fibrine, d'y trouver 13 p. 100 de *l*-leucine.

Méthode de Brazier [37]. — L'auteur met à profit le fait que les sels de cuivre des acides aminés sont plus ou moins solubles dans l'eau, l'alcool méthylique et l'alcool éthylique. Le point essentiel est d'opérer toujours sur des sels de cuivre parfaitement desséchés par l'acétone pure et d'utiliser des solvants anhydres.

Brazier part de 231 grammes de zéine pure qu'elle hydrolyse pendant 24 heures avec de l'acide sulfurique à 25 p. 100. Après élimination de l'acide sulfurique par la baryte, elle chasse l'ammoniac par un courant d'air et forme les sels de cuivre en faisant bouillir la solution des acides aminés avec un excès de carbonate de cuivre. Elle arrive ainsi à considérer :

A. Acides aminés dont les sels de cuivre sont insolubles dans l'eau (leucine, phénylalanine et acide aspartique).

B. Acides aminés dont les sels de cuivre sont solubles dans l'eau:

a) Insolubles dans l'alcool méthylique (alanine, tyrosine, acide glutamique, histidine, arginine et glycocolle).

b) Solubles dans l'alcool méthylique (valine, hydroxyvaline, proline, isoleucine).

Cette technique a permis à son auteur d'isoler 22,2 p. 100 de leucine et 3,9 p. 100 de valine. Elle paraît supérieure à celle de E. Fischer, puisqu'on retrouve 89 p. 100 de l'azote identifiable sous la forme d'acides aminés isolés, tandis qu'avec la seconde méthode on n'en retrouve pas plus de 75 p. 100.

Toutefois la valeur relative à la valine paraît élevée si l'on tient compte des résultats d'Osborne et Clapp (0,29 p. 100). En outre, lorsque Brazier, isole la leucine de l'acide aspartique, elle retrouve les taux d'azote théorique : 10,68 p. 100 au lieu de 10,69 p. 100 pour le premier de ces acides aminés. 10,50 p. 100 au lieu de 10,53 p. 100 pour le second ; mais il n'en est plus de même pour la valine. Celle-ci, est accompagnée de l'hydroxyvaline et séparée de l'ensemble : proline + isoleucine + leucine (en faible quantité) + tyrosine (en faible quantité), en faisant plusieurs extractions par l'alcool absolu qui dissout ces derniers, présents dans la même fraction des sels

de cuivre. Le mélange valine + hydroxyvaline titre 11,60 p. 100 d'azote. Il est transformé en sels de zinc sur lesquels on fait agir l'alcool absolu pour dissoudre le sel de zinc de l'hydroxyvaline. La valine isolée accuse une teneur en azote de 11,60 p. 100 (taux théorique = 11,96 p. 100), l'hydroxyvaline donnant 10,51 p. 100 d'azote contre 10,53 p. 100 d'azote, chiffre théorique. Etant donnée la précision avec laquelle les dosages d'azote sont réalisés, la valine isolée par Brazier ne peut pas être considérée comme pure.

Si cette méthode est relativement rapide pour le dosage de la leucine, elle demande plusieurs semaines pour celui de la valine. Elle nécessite encore des quantités importantes de protéines pour réaliser des cristallisations fractionnées donnant des résultats acceptables.

Méthode de Dakin [47]. — Dakin [47] utilise l'alcool butylique pour séparer les acides aminés en deux groupes. Nous résumerons cette technique de la façon suivante :

Dans un premier temps hydrolyser la matière protéique par l'acide sulfurique et éliminer ce dernier par la baryte. Extraire ensuite certains acides aminés grâce à l'emploi de l'alcool butylique, en renouvelant le solvant chaque 12 ou 24 heures. L'alcool butylique extrait la proline, l'oxyproline, l'alanine, une partie du glycocolle, la valine, la leucine et la phénylalanine. En solution aqueuse demeurent les bases hexoniques, les acides aspartique et glutamique et du glycocolle. Par la suite, il faut séparer la proline du mélange d'acides aminés par action de l'alcool éthylique et effectuer sur les autres des cristallisations fractionnées. Toutefois, l'auteur même signale qu'il existe des difficultés pour séparer la leucine de la phénylalanine ; il sépare le bloc : leucine + phénylalanine constituant 8,5 p. 100 dans lequel il trouve « approximativement 7,1 p. 100 de leucine + 1,4 p. 100 de phénylalanine » et pas de valine (cas de la gélatine).

En somme, si cette méthode élégante permet d'isoler facilement la proline en lui conservant sa configuration optique, but essentiel de la technique de Dakin, et de séparer assez facilement certains acides aminés, elle est assez longue et nécessite de multiples cristallisations fractionnées, ce qui entraîne nécessairement des pertes.

Méthode de Barnett [28]. — Cette méthode a pour but de séparer la leucine sous la forme de chlorhydrate de dileucine obtenu par Schwanert [155] en 1857, dont on libère ensuite la leucine qu'on purifie.

Le chlorure de sodium utilisé au cours de cette technique intervient comme agent de relargage. L'auteur base son mode opératoire sur l'existence d'une zone de pH dans laquelle la leucine libre est relarguée, une autre zone dans laquelle le chlorhydrate de dileucine est relargué et enfin une troisième zone dans laquelle c'est le chlorhydrate de leucine qui est relargué. La courbe de solubilité de la leucine dans l'eau montre que celle-là passe par un minimum pour un pH égal à 6 (2,40 g. de leucine dans 100 cm^3 d'eau) et qu'elle est maxima pour les pH inférieurs à 2 d'une part et supérieurs à 10 d'autre part (7,50 g. p. 100 cm^3). L'addition de NaCl à saturation diminue beaucoup la solubilité de la leucine puisque pour un pH compris entre 3,0 et 9,5 cette solubilité est de 0,75 g. p. 100 cm^3 environ.

La précipitation optima de chlorhydrate de dileucine est réalisée à un pH compris entre 2,2 et 2,6. Ce corps est un composé très instable dont le simple lavage à l'eau libère la leucine et l'acide chlorhydrique.

Voici, du reste, un résumé de la technique employée par cet auteur :

500 g. de caséine commerciale (N = 13,69 p. 100) sont dissous dans 1360 cm^3 d'acide chlorhydrique à 20 p. 100, à 70°, pendant 1 heure puis bouillis sous refrigérant à reflux pendant 16 heures. L'hydrolysat est concentré sous pression réduite pour chasser HCl au maximum, étendu avec 2 litres d'eau chaude et on ajoute 190 cm^3 de soude 12 N de manière à obtenir un pH voisin de 2,4. La solution est décolorée au noir animal, filtrée, abandonnée au froid afin d'éliminer la tyrosine et on concentre à 900 cm^3, ce qui entraîne la formation d'un précipité de NaCl et le relargage du chlorhydrate de dileucine. On isole ce dernier qu'on lave avec une solution saturée de NaCl et redissout dans 600 cm^3 d'eau chaude ; l'addition d'une solution de soude, en présence de rouge de méthyle, libère de la leucine qui précipite ; on la recueille et la lave. L'eau mère et les eaux de lavage sont à nouveau concentrées et le second précipité de leucine est ajouté au premier. On obtient ainsi 34,50 g. d'un produit qu'on purifie dans l'alcool méthylique à 70 p. 100, à chaud ; on isole finalement 28,1 g. de leucine pure dont le point de fusion est de 314-315°. Le taux d'azote dans la caséine pure étant de 15,6 p. 100, Barnett est parti de 448,5 g. de caséine ; il isole donc 6,2 p. 100 de leucine pure. De la même manière, cet auteur arrive à isoler 10,8 g. de leucine en partant de 500 grammes de gluten.

La méthode proposée par Barnett apparaît davantage comme une technique d'isolement permettant d'obtenir un bon produit qu'une méthode de dosage rigoureux. Il est à craindre que la récupération de la leucine ne soit pas totale d'une part, et bien que l'auteur indique que cette technique est, d'autre part, spécifique de la leucine, n'y a-t-il pas à craindre que de la valine soit isolée en même temps ?

Ayant rappelé les principales méthodes de dosage des acides aminés, nous devons constater, en dehors des critiques que nous avons déjà formulées contre chacune d'elles, qu'aucune de ces méthodes ne met en œuvre une technique appropriée au dosage simultané de la leucine et de la valine dans un hydrolysat protéique. Toutes ne sont applicables qu'à la condition de disposer de quantités importantes de matières premières, ce qui en biochimie est parfois un grave inconvénient. Aussitôt que ces quantités sont trop faibles, ou la méthode n'est plus applicable, ou les erreurs réalisées sur les dosages respectifs de la leucine, de la valine et de l'isoleucine sont très grandes. Fischer applique sa méthode à 500 grammes de caséine, et parfois à 1.000 grammes de protéine. Brazier utilise 230 grammes de zéine. Dakin part de 250 grammes de gélatine et Barnett de 500 grammes de caséine. Osborne et Jones ont montré l'importance des pertes en acides aminés dans la méthode de Fischer, pertes atteignant en moyenne 30 p. 100. On comprend aisément que celles-ci puissent être encore plus importantes à mesure qu'on cherche à partir d'un poids de protéine de plus en plus faible. Quand il s'agit de doser des acides aminés dans un pigment respiratoire tel que l'érythrocruorine dont l'obtention de quelques grammes nécessite le sacrifice de plusieurs milliers d'arénicoles et une longue préparation, il n'est pas possible d'avoir recours à ces procédés de dosage.

Enfin, toutes ces méthodes font intervenir des séries de cristallisations fractionnées pour séparer et purifier les divers amino-acides, ce qui entraîne inévitablement des pertes.

Nous ne pouvons mieux faire pour montrer leurs imperfections que de donner, à titre de comparaison, les résultats relatifs aux taux de leucine et de valine qu'elles ont permis de déterminer dans diverses protéines.

II. — **Résultats.**

Nous avons rassemblé dans le tableau I les résultats obtenus par divers auteurs sur la teneur en leucine et en valine des protéines.

TABLEAU I. — *Teneur en leucine et en valine p. 100 de diverses protéines.*

Protéine	Leucine p. 100	Valine p. 100	Auteur
Albumine de Bence-Jones	6,5	5,6	Hopkins et Savory [83].
Caséine	7,92	0,69	Levene et van Slyke [99].
	10,5	—	Fischer [59].
Ecailles de Tortue	3,26	5,23	Buchtala [38].
Edestine de Chènevis	8,1	5,6	Levene et van Slyke [99].
Edestine de graines de Tournesol	12,9	0,6	Abderhalden et Reinbold [14].
Edestine de graines de Cotonnier	15,5	—	Abderhalden et Rostoski [15].
Elastine	21,38	1,0	Abderhalden et Schittenhelm [17].
Fibrine	13,00	—	Levene et van Slyke [98].
	15,00	1,0	Abderhalden et Voitinovici [22].
Fibroïne (soie Haruko)	0,7	—	Suwa Akikazu [161].
(soie Canton)	1,5	—	Abderhalden et Berhend [10].
Gélatine	2,1	—	Eischer, Levene et Aders [64].
	6,8	—	Levene et Beatty [96].
	7,1	0	Dakin [47].
Gliadine	5,61	0,21	Osborne et Clapp [117].
	6,00	0,33	Abderhalden et Samuely [16].
	6,6	3,34	Osborne et Guest [121].
Glycinine du Soja	8,45	0,68	Osborne et Clapp [118].
Kératine, épiderme d'Eléphant	3,6	2,43	Buchtala [39].
crins de Cheval	7,1	0,9	Abderhalden et Wells [23].
plumes d'Oie	8,0	0,5	Abderhalden et Le Count [11].

TABLEAU I (*suite*). — *Teneur en leucine et en valine p. 100 de diverses protéines.*

Protéine	Leucine p. 100	Valine p. 100	Auteur
Kératine, laine de Mouton	11,5	2,8	Abderhalden et Voitinovici [21].
cornes de Mouton	15,3	4,5	Abderhalden et Voitinovici [21].
cheveux blancs	12,12	—	Buchtala [40].
peau de Boa	12,4	—	Buchtala [41].
cornes	18,3	5,7	Fischer et Dörpinghaus [83].
Lactalbumine	—	0,9	Abderhalden et Pribram [13].
	14,0	3,3	Jones et Johns [84].
Ovalbumine	15,2	—	Abderhalden et Pregl [12].
	17,0	—	Levene et Beatty [97].
	10,7	2,5	Osborne, Jones et Leavenworth [123].
Oxyhémoglobine crist.	17,5	1,0	Abderhalden et Baumann [9].
	20,01	—	Fischer et Abderhalden [62].
Peptone de Witte	Somme : Leucine + valine = 14,70		Levene et van Slyke [98].
Protéines graines de Lin	3,97	12,71	Foreman [67].
	Leucine + isoleucine		
Protéines de Pomme de terre	12,2	1,1	Sjollema et Rinkes [157].
Serumalbumine	20,0	—	Mörner [110].
Serumglobuline	Somme : Leucine + valine = 18,7		Abderhalden [4].
Zéine	11,25	—	Langstein [94].
	17,25	—	Ritthausen [133].
	18,30	—	Osborne et Jones [122].
	18,60	0,29	Osborne et Clapp [119].
	22,2	3,9	Brazier [37].

Nous n'entreprendrons pas une discussion sur les valeurs obtenues par ces auteurs, nous bornant ici à noter les écarts parfois considérables qui séparent des résultats relatifs à une même protéine. L'exemple le plus frappant à ce point de vue est donné par la zéine : les cinq chiffres relevés sont différents et il semble que les techniques de dosage permettent de se rapprocher de plus en plus du taux exact de la leucine à mesure qu'elles sont plus récentes. Quant à la teneur en valine de la zéine, les écarts entre les valeurs des divers auteurs à son sujet sont encore plus considérables.

LA LEUCINE ET LA VALINE DANS LES MOLÉCULES PROTÉIQUES.

Dans l'exposé antérieur, nous avons eu l'occasion de mettre en évidence la présence constante de leucine et de valine dans diverses protéines animales ou végétales. Ceci permet de penser que ces deux amino-acides doivent jouer un rôle important dans les protéines, en tant qu'éléments structuraux de l'édifice moléculaire.

Les recherches d'ordre physique (spectre de rayons X entre autres) dont les diverses protéines ont été l'objet nous font envisager la molécule protéique comme constituée par un squelette formé par une juxtaposition de chaînes polypeptidiques sur lesquelles se greffe un nombre plus ou moins important d'acides aminés. Ces chaînes sont capables de se raccourcir (β-kératine → α-kératine) pour donner naissance à des arrangements moléculaires différents (Astbury et Woods [27]), dont l'aspect offrirait quelque analogie avec celui des dicetopipérazines (cyclol de Wrinch [170]). Toutefois, ces résultats n'ont pas définitivement éclairci la constitution de la molécule protéique.

Nous pouvons nous demander quel est le rôle joué par la leucine et la valine dans la molécule protéique et quelle place elles y occupent. Jusqu'à présent, aucune donnée ne nous permet de répondre à cette question, exception faite pour un petit nombre, acquis par Bergmann et Niemann [33], Schoenheimer, Ratner et Rittenberg [148]. La valine et la leucine occupent-elles l'une et l'autre une position centrale, faisant partie intégrante d'un squelette polypeptidique fondamental ou bien leur

répartition est-elle uniquement périphérique, en ce sens qu'elles pourraient concourir à la structure des chaînes qu'on peut qualifier de secondaires, c'est-à-dire de groupements peptidiques assez simples rattachés par des liaisons plus ou moins solides au squelette de la molécule (chaînes fondamentales) ?

Pour essayer de résoudre ce problème nous devons nous adresser à diverses recherches mettant en œuvre la libération de la leucine et de la valine en fonction du temps, par action des acides ou des bases d'une part, des enzymes protéolytiques d'autre part. Nous n'avons pas connaissance de travaux mettant en œuvre l'hydrolyse acide ou alcaline d'une protéine pour doser la leucine et la valine libérées en fonction du temps d'hydrolyse. En ce qui concerne l'action des divers enzymes protéolytiques nous savons qu'elle est différente sur un même substrat. On peut donc espérer, en comparant les résultats de l'action des agents de l'hydrolyse chimique enzymatique, obtenir des renseignements sur la position de la leucine et de la valine ou tout au moins des groupements isopropyliques qui caractérisent ces corps.

A la suite des travaux de Frankel (1916, [68]), de Bergmann et ses collaborateurs (1935, 1936 et 1937 [33, 30, 32, 31]), de Miller et Calvery (1926, [106]), de Linderström-Lang (1933, [101]) et d'autres biochimistes, on s'accorde à classer les protéases en deux groupes : les endopeptidases et les exopeptidases, suivant la terminologie de Bergmann. Les premières (trypsine, pepsine et papaïne pures) agissent sur les liaisons peptidiques quand ces dernières ne sont pas voisines d'un $— NH_2$ ou d'un — COOH libres, ce qui est généralement le cas à l'intérieur des chaînes peptidiques. Les endopeptidases scindent la molécule en polypeptides hydrolysables par les exopeptidases (carboxypeptidases, aminopeptidases, dipeptidases). Cependant, Miller et Calvery ont pu isoler de la tyrosine libre après l'action de la pepsine sur la lactalbumine, et Bergmann et Niemann [33] divers acides aminés (tyrosine, phénylalanine, tryptophane, leucine et isoleucine) en faisant agir la papaïne sur de la fibrine.

Les travaux de Schoenheimer et ses collaborateurs sur le cycle de la leucine dans l'organisme animal apportent aussi une contribution à l'étude du même problème. L'usure des tissus dans l'inanition protéique et la réparation des pertes azotées (A. Roche [134, 135]) sont les témoins de la plasticité de la molécule protéique et des changements continuels dont

celle-ci est le siège. Pour mettre ces derniers en évidence, SCHOENHEIMER et ses collaborateurs eurent l'idée d'utiliser dans un régime de la *l*-leucine contenant deux isotopes, un de l'hydrogène (deutérium $_2H$) et un de l'azote (azote lourd $_{15}N$). Le régime fut donné à quatre rats adultes et les auteurs constatèrent que 57 p. 100 de la leucine marquée se trouvaient dans diverses protéines, 29,7 p. 100 étaient rejetés dans les excréta et 8,0 p. 100 pouvaient être identifiés dans l'azote non protéique (extrait aqueux trichloracétique). De plus, ils isolèrent de l'acide glutamique, de l'arginine et de l'acide aspartique contenant de l'azote marqué. Ces échanges continuels entre les molécules d'acides aminés ont été désignés sous le nom de *transpeptidation*. Ce fait impliquerait pour SCHOENHEIMER l'« écartement » de peptides entre lesquels s'insère la leucine ; mais l'on doit se demander s'il n'est pas plus logique de l'interpréter comme traduisant le fait que les molécules de leucine en bout de chaînes polypeptidiques, ou en chaîne latérale sont facilement remplaçables par un processus de transpeptidation ne comportant pas de remaniement profond des chaînes peptidiques fondamentales. On ne connaît que les résultats de ces remplacements sans en connaître le mécanisme. Toutefois ils conservent à la molécule protéique son unité de structure.

Comme on peut le voir par ce court rappel de quelques travaux, la position de la leucine dans les molécules protéiques est mal définie. Il semble que cet acide aminé soit particulièrement labile et occupe dans les molécules protéiques une position permettant sa mise en liberté sans modification générale profonde de l'architecture de celle-ci.

Aucune hypothèse ne peut être faite à ce sujet en ce qui concerne la valine.

OBJET DU TRAVAIL.

La principale critique que nous avons adressée aux méthodes de dosage de la leucine et de la valine est de nécessiter des quantités importantes de matières protéiques sans, pour cela, comporter une précision rigoureuse. Si toutes ces méthodes sont différentes au début des opérations qui caractérisent chacune d'elles (formation et distillation d'esters dans la méthode de FISCHER, formation immédiate de sels de cuivre

dans la méthoe de Brazier, extraction par l'alcool butylique dans la méthode de Dakin, formation et isolement de chlorhydrate de dileucine dans la méthode de Barnett), elles comportent toujours une série de cristallisations fractionnées en vue d'obtenir un corps pur, dont on suit le degré de purification au moyen de tests chimiques ou physiques.

Il nous a paru utile de mettre au point une méthode de dosage de la leucine et de la valine susceptible d'être appliquée à des hydrolysats protéiques quand on dispose d'une quantité maxima de protéine de l'ordre de 500 milligrammes.

La mise au point de cette technique une fois réalisée, nous l'avons appliquée au dosage de la leucine et de la valine dans de nombreuses protéines, afin d'apporter une contribution à l'étude de la constitution de celles-ci d'une part, et au problème de la spécificité de divers chromoprotéides respiratoires d'autre part.

Nous avons ensuite essayé de déterminer l'emplacement de ces acides aminés dans des molécules protéiques en dosant la leucine et la valine, ou plus exactement les groupements isopropyliques, dans des hydrolysats protéiques en fonction du temps de leur hydrolyse soit acide soit alcaline.

Enfin, l'étude des actions d'enzymes protéolytiques : pepsine, papaïne et mélange des enzymes trypsiques (pancréatine), sur diverses protéines a permis une comparaison de ces actions diastasiques entre elles et avec celles de l'hydrolyse réalisée par voie chimique.

Les trois chapitres successifs de l'exposé de nos recherches sont consacrés à l'étude de l'un de ces problèmes.

RECHERCHES PERSONNELLES.

CHAPITRE I.

DOSAGE DE LA VALINE ET DE LA LEUCINE DANS LES PROTÉINES.

A. — Principe de la méthode.

Nous avons adopté le principe du dosage de la leucine et de la valine reposant sur la transformation en acétone du groupement isopropylique de ces acides aminés et mis au point une méthode permettant d'appliquer ce principe au dosage de la leucine et de la valine dans les protéines.

Fromageot et Heitz [70] ont décrit le principe d'une méthode permettant de doser la valine et la leucine dans un mélange d'acides aminés purs, basée sur la formation d'acétone aux dépens du groupement isopropylique de chacun de ces corps. Dans un premier temps la leucine et la valine sont désaminées en oxyacides correspondants (acides α-oxyisocaproïque et α-oxyisovalérianique) :

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!\!>\!CH-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + NO_2H = \begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!\!>\!CH-CH_2-CHOH-COOH + N_2 + H_2O$$

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!\!>\!CH-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + NO_2H = \begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!\!>\!CH-CHOH-COOH + N_2 + H_2O$$

Dans un deuxième temps ces derniers sont oxydés dans des conditions telles que les rendements en acétone permettent de calculer les teneurs en leucine et en valine dans le mélange considéré. En effet, pour chacun de ces oxyacides, on réalise

ce que les auteurs appellent une *oxydation directe* et, séparément, une *oxydation sous pression*, chacune de ces oxydations étant suivie de la distillation de l'acétone produite. L'agent oxydant de choix est l'acide chromique en solution à 10 p. 100, l'oxydation sous pression étant faite en milieu acétique.

Les valeurs des rendements en acétone sont suffisamment éloignées pour permettre de résoudre deux équations donnant le taux d'acétone, y, correspondant à la leucine et celui, x, correspondant à la valine.

B. — Description de la méthode.

En collaboration avec C. Fromageot [71] nous avons apporté divers perfectionnements techniques à cette méthode, que nous avons appliquée au dosage de la leucine et de la valine dans les protéines. La détermination du taux de ces deux acides aminés dans les hydrolysats protéiques peut être réalisée avec une précision de ± 5 p. 100.

Le dosage comporte les diverses opérations suivantes :

1° Hydrolyse de la matière protéique.

2° Transformation des acides aminés en hydroxyacides.

3° Oxydation et distillation directe de l'acétone d'une fraction des hydroxyacides.

4° Oxydation sous pression et distillation de l'acétone d'une autre fraction des hydroxyacides.

5° Dosage de l'acétone obtenue au cours de chacune de ces oxydations.

6° Calcul des résultats.

Voici d'abord, avant la description des diverses opérations du dosage, la liste des *réactifs nécessaires* :

1. Acide sulfurique 6 N.
2. Eau de baryte saturée à chaud.
3. Solution d'acide chromique à 10 p. 100.
4. Acide acétique glacial.
5. Solution d'urée à 7,5 p. 100.
6. Solution de nitrite de soude à 2,5 p. 100.
7. Solution de potasse 11,3 N.
8. Réactif salicylique (aldéhyde salicylique 5 cm³, alcool à 95°, 71 cm³).

1° *Hydrolyse de la protéine.* — 1 gramme de la matière protéique à étudier est introduit dans un ballon en verre Pyrex d'environ 100 cm^3 de capacité et on ajoute 20 cm^3 d'une solution de SO_4H_2 6N, avec une perle de verre destinée à régulariser l'ébullition. Le ballon est adapté à un réfrigérant à reflux ; le chauffage est réalisé progressivement, au bain de sable, pendant une heure environ, de façon à ce que la protéine ne se détruise pas par une brusque élévation de température tant qu'elle adhère au fond du ballon. Dès qu'une douce ébullition est obtenue on la maintient pendant 38 heures. Au bout de ce temps, on arrête le chauffage, on introduit une dizaine de centimètres cubes d'eau distillée par le sommet du refrigérant à boules et on transvase l'hydrolysat, plus ou moins foncé, dans un tube de centrifugeuse. On précipite une partie de l'acide sulfurique par de l'eau de baryte chaude de façon à ce que le volume final de l'hydrolysat renferme 3,5 cm^3 SO_4H_2 N par 20 cm^3 d'hydrolysat (0,175 N), ceci dans un double but : d'abord, cette concentration en acide sulfurique est celle qui assure le meilleur rendement en acétone au moment des oxydations, soit directe, soit sous pression ; par ailleurs, on évite ainsi l'adsorption par le sulfate de baryum des deux acides aminés à doser. Après centrifugation, on recueille dans un ballon jaugé de 500-cm^3 le liquide surnageant, coloré en jaune clair, et on lave le culot de centrifugation à cinq reprises, chaque fois avec 50 cm^3 d'eau distillée bouillante, en ayant soin de triturer le précipité. On joint les eaux de lavage à l'hydrolysat et on complète à 500 cm^3. Sur une prise de 20 cm^3 on vérifie bien que l'acidité est sensiblement égale à 3,5 cm^3 SO_4H_2N. C'est sur des fractions aliquotes de cette solution qu'on réalise les autres opérations. Indiquons qu'il est possible d'hydrolyser un poids de protéine inférieur à 1 gramme, par exemple 0,500 gramme. Dans ce cas, la dilution finale doit être de 250 cm^3.

2. *Désamination.* — Elle est faite dans l'appareil représenté par la figure 1. Cet appareil comprend : un ballon à fond rond en verre Pyrex (A) d'une capacité d'environ 200 cm^3, muni d'un rodage normalisé n° 2 ; un système d'agitation rotative composé d'un bouchon en caoutchouc traversé par un axe creux en verre dans lequel passe l'agitateur en verre également creux. Une poulie en bois pouvant être fixée sur ce dernier grâce à une vis de serrage en cuivre est entraînée par une

élastique montée sur la poulie d'un petit moteur électrique. L'extrémité de l'agitateur est effilée et munie de deux ailettes destinées au brassage de l'hydrolysat. Une ampoule (B) reçoit la solution de nitrite de soude et, ensuite, celle d'urée. On introduit 20 cm³ de l'hydrolysat dans le ballon (A) et 55 cm³ d'eau distillée. On adapte le système d'agitation rotative et on place le ballon dans un bain-marie bouillant. Quand le contenu du ballon a atteint la température de l'eau bouillante on met l'agitateur en marche et on fait tomber goutte à goutte, par l'intermédiaire de la boule à brôme, d'abord 16,5 cm³ d'une solution de nitrite de soude à 2,5 p. 100, ensuite 15 cm³ de la solution d'urée à 7,50 p. 100. L'écoulement doit être réglé de manière à durer de 15 à 20 minutes pour chacune des solutions considérées. L'opération terminée on sépare l'appareil à agiter du ballon et on relie ce dernier à un dispositif à concentrer sous vide muni d'un rodage normalisé n° 2, s'adaptant par conséquent à celui du ballon. La concentration s'effectue au bain-marie bouillant ; elle demande quinze à vingt minutes et on l'arrête quand il reste une dizaine de centimètres cubes de liquide au fond du ballon. Ce liquide présente une teinte jaune plus ou moins foncée suivant la nature de la protéine analysée.

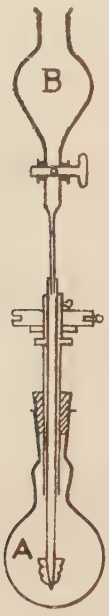


FIGURE 1.

Appareil servant à la désamination de la leucine et de la valine.

3. *Oxydation par distillation directe.* — L'appareil utilisé est celui de la figure 2, dans lequel l'ampoule B' a une capacité de 22 à 24 cm³ ; le ballon A est celui de la figure 1. Un rodage normalisé N° 2 permet d'adapter le ballon au réfrigérant F dont la pointe plonge dans un ballon jaugé C de 100 cm³. Le liquide concentré, contenant les hydroxyacides, est transvasé quantitativement dans l'ampoule B', on rince à plusieurs reprises le ballon A avec chaque fois 2 cm³ d'eau distillée et on joint les eaux de lavage au liquide concentré contenu déjà dans l'ampoule B'. On introduit dans le ballon A, d'abord 5 cm³ d'une solution d'acide chromique à 10 p. 100 puis 20 cm³ d'eau distillée, et enfin une perle de verre destinée à régula-

riser l'ébullition au cours de la distillation. On adapte le ballon au réfrigérant, le fond du ballon reposant sur de la toile métallique posée sur un trépied. Avec un agitateur fin on homogénéise le contenu de l'ampoule B'. Le ballon jaugé de 100 cm³ d'eau distillée plonge dans un cristallisoir dans lequel on a mis de l'eau et de la glace. Avant d'effectuer la distillation il est nécessaire d'attendre que l'eau distillée soit froide. Après quoi, on chauffe avec une flamme très douce et, lorsque l'ébullition commence, on laisse tomber goutte à

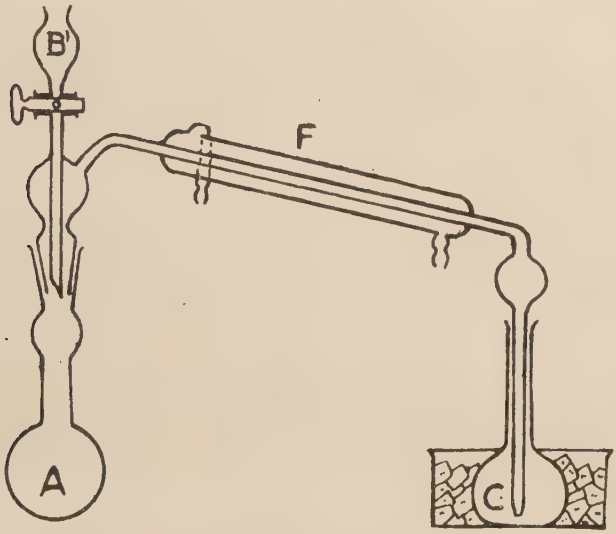


FIGURE 2. — *Appareil servant à la distillation* (directe) *de l'acétone formée à partir de leucine et de valine désaminée.*

goutte la solution des hydroxyacides contenue dans l'ampoule B'. L'addition de solution est réglée de telle sorte qu'elle soit totale en 20-25 minutes ; les vitesses d'addition et de distillation doivent sensiblement se compenser, en sorte que le volume du liquide dans le ballon A reste constant. Quand toute la solution a été introduite, on ajoute 5 cm³ d'eau distillée dans l'ampoule B', de façon à rincer celle-ci et on fait écouler cette eau goutte à goutte pendant 5 minutes ce qui entraîne une distillation de 25 à 30 minutes. On retire rapidement le ballon C et on arrête le chauffage. On complète au trait de jauge par addition d'eau distillée, on homogénéise par agitation et on procède au dosage colorimétrique de l'acétone sur

2 cm³ de la solution. Notons que cette solution présente une odeur plus ou moins forte de phénylacétaldéhyde provenant de l'oxydation de la phénylalanine par l'acide chromique Fischer [59].

4. *Oxydation sous pression.* — Elle est réalisée dans un appareil très simple (figure 3) consistant en un ballon (A') en verre Pyrex, toujours muni d'un rodage normalisé n° 2 auquel on peut adapter un bouchon en verre Pyrex avec robinet, ce qui permet de diminuer la pression existant dans le ballon.

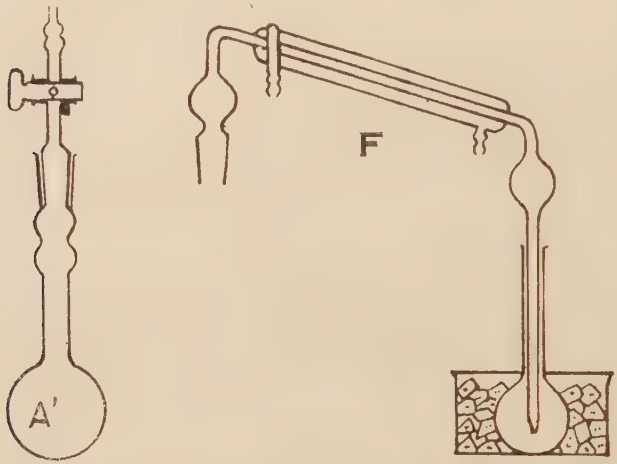


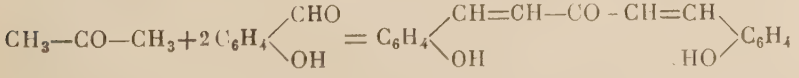
Figure 3. — *Appareil servant à l'oxydation sous pression de la leucine et de la valine après désamination: F. Détail de l'appareil à distiller l'acétone s'adaptant au ballon d'A'.*

Un étranglement vers le haut du col du ballon permet d'y adapter un dispositif de fermeture (collier métallique) constitué par deux tendeurs à ressort munis d'un crochet se fixant solidement sur le robinet de verre pour maintenir le bouchon porteur du robinet au col du ballon.

Une autre portion de l'hydrolysat ayant subi la désamination et concentrée à environ 10 cm³ est introduite dans ce ballon (A'). La solution des hydroxyacides à laquelle on a joint les eaux de lavage doit occuper un volume d'environ 20 cm³. On ajoute ensuite 5 cm³ de la solution d'acide chromique à 10 p. 100 et 4 cm³ d'acide acétique glacial pur. On agite pour décomposer l'excès d'urée, on adapte le robinet qu'on fixe avec les tendeurs et on fait le vide avec une trompe à eau

jusqu'à ce qu'on note un commencement d'ébullition dans le ballon ; à ce moment, on ferme le robinet. Ce détail a pour but d'éviter le bris du ballon qui se produisait parfois lorsqu'on se contentait, antérieurement, d'opérer dans un ballon pourvu d'une fermeture identique à celle qu'on trouve sur les flacons canette. Ceci fait, on place le ballon au bain-marie bouillant pendant 4 heures. Au bout de ce temps on l'enlève et le refroidit d'abord sous un courant d'eau froide pendant 5 minutes, ensuite dans un mélange réfrigérant (bain de glace) pendant 10 minutes. On introduit un peu d'eau dans la partie effilée qui surmonte le robinet et, en ouvrant doucement celui-ci, on fait pénétrer l'eau dans le ballon ; ainsi, en répétant trois fois cette même opération, on lave la partie inférieure du robinet et le col du ballon. Après avoir enlevé les tendeurs et le robinet on adapte très vite le ballon à l'appareil à distiller (F) de la figure 3, plus simple que celui représenté par la figure 2, mais toujours muni d'un rodage normalisé. La distillation doit durer de quinze à dix-sept minutes et les deux tiers du liquide environ doivent distiller, ce qui assure le passage complet de l'acétone formée pendant les quatre heures de chauffage au bain-marie bouillant. Le ballon récepteur est abaissé ; l'extrémité du refrigérant est rincée ; on cesse de chauffer ; on neutralise l'acide acétique qui a distillé en grande partie par une solution de potasse concentrée, en présence d'un petit morceau de papier de tournesol et on complète exactement à 100 cm³.

5. *Dosage de l'acétone.* — L'acétone formée par oxydation des groupements isopropyliques est dosée suivant une méthode colorimétrique qui met à profit la coloration orangée développée par action de l'acétone sur l'aldéhyde salicylique en milieu fortement alcalin. C'est la réaction de Fabinyi [56].



Le milieu de réaction est rendu alcalin par de la potasse 11,3 N. La réaction colorée est réalisée dans un tube à essai dans lequel on introduit successivement : 2 cm³ de solution acétonique, 2 cm³ de solution de potasse 11,3 N et 1 cm³ de la solution alcoolique d'aldéhyde salicylique. Un témoin est constitué dans lequel on remplace les 2 cm³ de la solution acétonique par 2 cm³ d'eau distillée. Les tubes sont soigneusement

bouchés, agités pour réaliser l'homogénéisation du milieu et placés dans un bain-marie à 50° pendant 1 heure de temps exactement, en ayant soin de faire en sorte que le niveau à l'intérieur des tubes ne soit placé ni plus bas, ni plus haut que le niveau de l'eau du bain-marie. En effet, si on enfonce trop les tubes on constate l'apparition de taches brunes sur la paroi intérieure et ces taches tendent à accentuer la coloration lorsqu'on opère la dilution. Au bout d'une heure on enlève les tubes du bain-marie, on les plonge presque complètement dans de l'eau contenant des morceaux de glace et cela pendant 5 minutes exactement. On dilue le contenu de chaque tube par addition de 10 cm³ d'eau distillée et on rend le tout homogène par agitation avant de procéder au dosage colorimétrique. Celui-ci s'effectue dans des cuves de 2 centimètres d'épaisseur, à l'aide du photomètre de Pulfrich et en prenant le filtre S_{53}, de teinte verte.

Dans ce qui suit, nous appelons D la transparence des solutions utilisées pour les dosages (I/I_0), et K le coefficient d'extinction défini par la valeur E/2, où l'extinction E = log 1/D. La courbe étalon est une droite passant par l'origine et dont la pente est telle que la valeur K = E/2 = 0,477 correspond à 76 γ d'acétone dans les 2 cm³ prélevés sur les 100 cm³ du distillat. Les points que nous avons déterminés pour tracer notre courbe sont les suivants :

K = E/2 (abscisses)	Acétone dans 2 cm³ de distillat (ordonnées)
—	—
0,108	17γ,9
0,183	29γ,8
0,266	43γ,1
0,322	51γ,8
0,377	60γ,4
0,477	76γ,0

Une fois que nous avons obtenu la quantité d'acétone apportée par 2 cm³ de solution nous calculons combien 100 cm³ de distillat contiennent d'acétone et nous désignons ces quantités par les lettres *a* ou *b* suivant qu'il s'agit d'acétone produite par oxydation sous pression ou par oxydation et distillation directe.

6. *Calcul des résultats.* — Nous ne ferons que rappeler les formules, donnant les quantités de valine et de leucine cherchées (Fromageot et Heitz [70], Heitz [79]).

Soient :

a, la quantité d'acétone totale produite au cours de l'oxydation chromique sous pression ;

b, la quantité d'acétone totale produite au cours de l'oxydation et distillation directe ;

u, le rendement en acétone produite, à partir de la valine, au cours de l'oxydation sous pression ;

u', le rendement en acétone produite, à partir de la valine, au cours de l'oxydation et distillation directe ;

v, le rendement en acétone produite, à partir de la leucine, au cours de l'oxydation sous pression ;

v', le rendement en acétone produite, à partir de la leucine, au cours de l'oxydation et de la distillation directe ;

x, la quantité d'acétone théorique correspondant à la valine ;

y, la quantité d'acétone théorique correspondant à la leucine.

On peut écrire que :

$$y = \frac{\frac{u'}{u}a - b}{\frac{u'}{u}v - v'} \qquad x = \frac{a - vy}{u}$$

et finalement :

Valine présente dans la prise d'essai = 2,02 x
Leucine présente dans la prise d'essai = 2,26 y

On voit que les formules donnant x et y font intervenir des différences entre des quantités qui sont parfois très voisines suivant la nature de la protéine analysée ; il en résulte que même si les erreurs sur a et b sont très faibles, les erreurs sur x et y sont assez fortes. Pour obtenir les valeurs de a et de b avec le plus de précision possible nous exécutons plusieurs dosages complets : *six désaminations*, dont *trois suivies d'une oxydation sous pression* et *trois autres d'une oxydation et distillation directe ;* sur chacun des distillats nous effectuons deux mesures colorimétriques. Ainsi, nous réalisons six mesures pour chaque mode d'oxydation et nous prenons finalement la moyenne de ces six mesures pour déterminer a et b. En opérant de cette façon, nous pensons pouvoir garantir que les dosages présentent une précision à $\pm$ 5 p. 100 près.

Les valeurs des coefficients u, u', v et v' sont déterminées en

préparant des solutions de valine et de leucine pures, en prélevant des parties aliquotes de ces solutions et en réalisant sur chacune d'elles une opération complète : désamination, oxydation et dosage de l'acétone. Les mêmes essais sont répétés trois fois et on prend la moyenne des valeurs obtenues. Ces coefficients ont ici les valeurs suivantes :

$$u = 0,611 \qquad v = 0,479$$
$$u' = 0,690 \qquad v' = 0,258$$

de sorte que les formules permettant de calculer y et x deviennent :

$$y = \frac{1,13\,a - b}{0,283} \qquad x = \frac{a - 0,479\,y}{0,611}$$

Nous croyons utile d'insister sur le fait que les désaminations et les oxydations doivent toujours être faites à partir d'un hydrolysat renfermant une quantité bien déterminée d'acide sulfurique. Les coefficients u, u' et v, v' déterminés en présence d'une certaine concentration en acide, ne sont utilisables que pour celle-ci. Nous avons pu nous convaincre de l'influence de la teneur en acide dans le milieu sur la valeur des coefficients en opérant en présence de quantités croissantes d'acide sulfurique. Le tableau ci-dessous met ces faits en évidence.

TABLEAU II. — *Rendement en acétone au cours du dosage de la valine par oxydation et distillation directe* (*).

Valine mise en œuvre (en mg.)	Acide sulfurique N utilisé (en cm³)	Acétone théorique (en mg.)	Acétone retrouvée (en mg.)	Rendement
10	3,0	4,95	3,50	70,7
10	3,0	4,95	3,49	70,6
10	3.5	4,95	3,40	68,6
10	3,5	4,95	3,39	68,4
10	3,5	4,95	3,39	68,4
10	5,0	4,95	2,80	56,0
10	5,0	4,95	2,90	58,0
10	5,0	4,95	2,70	54,5
10	8,0	4,95	2,41	48,6
10	8,0	4,95	2,39	48,3
10	10,0	4,95	2,10	42,4
10	10,0	4,95	2,00	40,4

(*) L'appareil qui a servi à déterminer ces valeurs n'est pas le même que celui ayant servi à déterminer les coefficients que nous avons donnés plus haut, d'où le faible écart constaté (0,690 et 0,684). Il est du reste indispensable de déterminer la valeur des coefficients pour un appareil donné et pour chaque expérimentateur.

On peut se demander si l'acide agit au moment de la désamination ou au cours de la distillation. L'expérience suivante semble montrer que c'est dans l'oxydation et la distillation qu'il faut rechercher la cause de ces perturbations. En effet, après avoir désaminé une même quantité de valine (10 milligrammes) en présence de 3,5 cm³ de SO_4H_2 N, avant d'effectuer la distillation, nous avons ajouté 2 cm³ de SO_4H_2 N dans le ballon contenant la solution d'acide chromique. Les résultats sont consignés ci-après ; le rendement est le même que si on avait ajouté dès le début 5,5 cm³ de SO_4H_2 N.

Valine mise en œuvre (en mg.)	Acétone théorique (en mg.)	Acétone retrouvée (en mg.)	Rendement
—	—	—	—
10	4,95	2,90	58,5

Nous avons voulu étendre cette recherche à la détermination du coefficient *v'* qui caractérise le rendement en acétone à partir de la leucine, par oxydation et distillation directe. Ici aussi, la concentration en acide sulfurique intervient sur le rendement comme le montre le tableau ci-dessous.

TABLEAU III. — *Rendement en acétone au cours du dosage de la leucine par oxydation et distillation directe* (*).

Leucine mise en œuvre (en mg.)	Acide sulfurique N utilisé (en cm³)	Acétone théorique (en mg.)	Acétone retrouvée (en mg.)	Rendement
10	3,0	4,42	1,39	31,5
10	3,0	4,42	1,30	29,4
10	3,0	4,42	1,20	27,1
10	3,0	4,42	1,29	29,1
10	9,0	4,42	0,78	17,6
10	9,0	4,42	0,74	16,7

Ces points essentiels de technique considérés, nous exprimons finalement les teneurs en leucine et en valine en pour cent de la protéine étudiée. Le calcul est fait en tenant compte du poids réel de la matière protéique après détermination de l'humidité et dosage de l'azote par la méthode de kjeldahl (microkjeldahl).

Nous allons donner d'abord une vérification de cette méthode à partir d'un mélange connu de valine et de leucine,

(*) Même observation que pour le tableau II.

ensuite un exemple du dosage de ces mêmes acides aminés dans une protéine, en faisant figurer toutes les valeurs nécessaires aux calculs.

C. - Contrôle de la méthode : Dosage de la valine et de la leucine dans un mélange de composition connue.

392 mg. de leucine et 372 mg. de valine pures sont additionnés de 20 cm³ de SO_4H_2 6N et soumis à l'ébullition pendant 39 heures. Au bout de ce temps, on traite par la baryte de façon à neutraliser partiellement l'acide sulfurique, et on opère selon les indications données ci-dessus de telle sorte que l'on ait un hydrolysat de 500 cm³ exactement. Les dosages se font ici sur des prises de 10 cm³ (7,86 mg. de leucine et 7,46 mg. de valine). Le tableau IV rend compte des valeurs obtenues.

TABLEAU IV. — *Résultats obtenus sur un mélange de leucine et de valine pures.*

Dosages faits sur un même mélange	Dosage de l'acétone sur un même distillat D		D moyen	K	*a* et *b*
	1er dosage	2e dosage			
	1° Oxydation directe				*b*
1re désamination ..	37,0	36,9			
2e désamination...	38,2	37,8	37,1	0,216	3,47
3e désamination...	37,7	35,0			
	2° Oxydation sous pression				*a*
1re désamination...	34,7	33,2			
2e désamination...	29,6	32,0	32,8	0,242	3,90
3e désamination...	33,6	34,0			

$y = 3{,}32$ $x = 3{,}78$

Leucine = 7,50 mg. (au lieu de 7,86) dans la prise d'essai

Valine = 7,63 mg. (au lieu de 7,46) dans la prise d'essai

soit finalement :

	Trouvé (mg.)	Pesé (mg.)	Erreur
Leucine	375	393	— 4,6 p. 100
Valine	381	372	+ 2,4 p. 100

D. — Dosage de la valine et de la leucine dans une protéine (édestine).

On trouvera ci-dessous un exemple de résultats obtenus sur une préparation d'édestine (Hoffmann-La Roche. Leur exposé (tableaux VI et VII) est destiné à montrer que la précision obtenue ne dépasse pas ± 5 p. 100 quand la méthode est mise en œuvre dans de bonnes conditions.

1re détermination :

Poids de la protéine sèche : 894 mg ; teneur en azote = 18,0 p. 100.

Teneur en azote de l'édestine pure : 18,6 p. 100.

Poids de la protéine pure soumise à l'analyse : 865 mg.

Durée de l'hydrolyse : 31 heures.

Volume final de l'hydrolysat : 500 cm³.

Volume des prises d'essai : 20 cm³.

TABLEAU V. — *Résultats obtenus sur l'édestine* (1er dosage).

Dosages faits sur un même hydrolysat	Dosage de l'acétone sur un même distillat D		D moyen	K	*a* et *b*
	1er dosage	2e dosage			
1° Oxydation directe :					
1re désamination...	57,9	57,5			
2e désamination...	57,3	57,6	57,5	0,120	0,960
3e désamination...	57,6	57,2			
2° Oxydation sous pression :					*a*
1re désamination...	52,8	53,0			
2e désamination...	52,0	52,0	52,5	0,140	0,120

$y = 1{,}077$ $x = 0{,}990$.

Leucine = 2,44 mg. Valine = 2,00 mg. dans les 20 cm³ de prise d'essai

Soit finalement, calculé en pour cent d'édestine pure :

Leucine : 7,05 p. 100 Valine : 5,78 p. 100.

2e détermination :

Poids de la protéine sèche : 894 mg. ce qui, comme dans le cas précédent, correspond à 865 mg. de protéine pure.

Durée de l'hydrolyse : 38 heures.

Volume final de l'hydrolysat : 500 cm³.

Volume des prises d'essai : 20 cm³.

TABLEAU VI. — *Résultats obtenus sur l'édestine* (2e dosage).

Dosages faits sur un même hydrolysat	Dosage de l'acétone sur un même distillat D'		D moyen	K	*a* et *b*
	1er dosage	2e dosage			
	1° Oxydation directe :				*b*
1re désamination ..	56,3	58,6			
2e désamination...	57,1	—	57,4	0,120	0,96
3e désamination...	57,6	57,3			
	2° Oxydation sous pression :				*a*
1re désamination ..	52,9	53,2			
2e désamination...	50,5	50,0	51,9	0,142	1,14
3e désamination...	52,8	—			

$y = 1{,}159$ $x = 0{,}958$.

Leucine = 2,62 mg. Valine = 1,94 mg. dans les 20 cm³ de prise d'essai.

Soit finalement, calculé en pour cent d'édestine pure :

Leucine : 7,57 p. 100 Valine : 5,61 p. 100.

La moyenne de ces deux déterminations pour la teneur de l'édestine en valine et en leucine donne les valeurs ci-après :

Leucine ..... 7,31 p. 100 (± 0,26 p. 100)
Valine ..... 5,70 p. 100 (± 0,09 p. 100)

L'écart p. 100 des résultats est donc ± 3,5 pour la leucine et ± 1,6 p. 100 pour la valine.

E. — Cas des protéines très riches en leucine.

Quelques rares protéines, la zéine, la thyroglobuline, des kératines sont très riches en leucine et pauvres en valine. Or, l'expérience nous a montré que lorsque la quantité de valine

présente dans un hydrolysat protéique est inférieure à 10 p. 100 de la quantité de leucine, l'application directe de la méthode décrite plus haut ne donne pas les résultats attendus. C'est ainsi qu'après avoir hydrolysé de la zéine par SO_4H_2 6 N, les quantités d'acétone obtenues par oxydation sous pression (*a*) et directe (*b*) sont telles que les calculs conduisent à une teneur en valine voisine de zéro (par exemple : après une durée d'hydrolyse acide de 40 heures, les valeurs de *a* et de *b* sont respectivement égales à 1,90 mg. et 0,94 mg., en sorte que nous trouvons une quantité de valine égale à - - 0,3 p. 100). Or, de la valine a été isolée en nature des hydrolysats de zéine. Aussi avons-nous pensé, qu'un excès important de leucine gênait le dosage dans les hydrolysats. Nous avons cherché à éliminer cet excès afin de nous retrouver dans des conditions expérimentales où le dosage de la valine en présence de leucine est possible. Nous avons réalisé cette élimination en utilisant la technique de fractionnement des acides aminés décrite par Brazier [67], basée sur les différences de solubilité de leurs sels de cuivre. Pour cet auteur, la leucine donne un sel de cuivre insoluble dans l'eau et la valine un sel soluble dans l'eau dans les conditions expérimentales adoptées. Nous avons pu toutefois constater que des quantités appréciables du sel de cuivre de leucine accompagnent le sel de valine en solution aqueuse. Ainsi se trouve réalisé l'enrichissement en valine et non la séparation quantitative de ces deux acides aminés. Voici le mode opératoire adopté :

On place 50 cm³ d'hydrolysat protéique dans un tube à centrifuger au bain-marie bouillant et on ajoute, par fractions et en agitant, du carbonate de cuivre pur en léger excès. On évapore et on sèche à l'étuve à 100° pendant 36 heures. Après avoir ajouté 25 cm³ d'eau distillée froide et fermé le tube avec un bouchon de caoutchouc, on place dans un agitateur mécanique pendant une heure. On centrifuge, filtre, lave deux fois le précipité avec 5 cm³ d'eau. La solution limpide, bleue foncée, est reçue dans un autre tube à centrifuger, acidifiée par HCl et on y fait passer lentement un courant d'H_2S de manière à éliminer le cuivre. Après centrifugation, filtration et lavage du précipité, on chasse H_2S et dilue à 50 cm³. Les dosages d'acétone sont faits sur des prises d'essai de 2 à 10 cm³ suivant la quantité de protéine hydrolysée.

Cette méthode a permis de déterminer la teneur en valine

de la kératine des cheveux, de la thyroglobuline et de la zéine avec une précision satisfaisante, comme le montre l'exemple ci-dessous.

Poids de kératine pure soumise à l'analyse : 1,263 g.
Durée de l'hydrolyse : 40 heures.
Volume final de l'hydrolysat : 50 cm³.
Volume de prise d'essai : 10 cm³.

Les résultats sont consignés dans le tableau VII.

TABLEAU VII. — *Dosage de la leucine et de la valine dans la kératine* (de cheveux humains).

Dosages faits sur un même hydrolysat	Dosage de l'acétone sur uu même distillat D		D moyen	K	*a* et *b*
	1er dosage	2e dosage			
		1° Oxydation directe :			*b*
1re désamination ..	21,3	21,4	21,2	0,337	2,71
2e désamination...	21,2	21,1			
		2° Oxydation sous pression :			*a*
1re désamination ..	13,2	13,3	13,5	0,435	3,48
2e désamination...	14,0	13,5			

$y = 4{,}29$ mg. $x = 2{,}32$ mg.

Valine = 4,68 mg. dans les 10 cm³ de prise d'essai (252 mg. de kératine).

Soit, en pour cent de kératine, 1,8 p. 100 de valine.

Conclusions du chapitre I.

Nous avons mis au point une méthode de dosage de la leucine et de la valine dans les protéines basée sur la transformation en acétone du groupement isopropylique de ces acides aminés (Fromageot et Heitz). Les temps principaux en sont : hydrolyse de la protéine par SO_4H_2 6 N, désamination de la leucine et de la valine, transformation des groupements isopropyliques en acétone, d'abord par oxydation chromique sous pression (*a*), ensuite par oxydation chromique directe (*b*), dosage de l'acétone, et calcul des taux de leucine et de valine

dans la protéine étudiée à partir du rendement en acétone de la leucine et de la valine pures.

Dans le cas des protéines très riches en leucine et pauvres en valine (kératine, thyroglobuline, zéine) il est nécessaire d'appauvrir l'hydrolysat en leucine : on y parvient en éliminant la plus grande partie de la leucine à l'état de sel de cuivre, peu soluble dans l'eau où le sel de cuivre de la valine est très soluble.

La technique proposée a permis d'obtenir des résultats précis à ± 5 p. 100 sur des quantités de leucine et de valine comprises entre 3 et 15 mg. Elle offre l'avantage sur les méthodes antérieures d'être plus spécifique, beaucoup plus rapide et d'être applicable à 0,500 g. de protéine.

CHAPITRE II.

TENEUR EN LEUCINE, EN VALINE ET EN ALANINE DES PROTÉINES ET DES PIGMENTS RESPIRATOIRES.

Les données figurant dans divers ouvrages sur la teneur en leucine et en valine des protéines ont été pour la plupart déterminées à l'aide des méthodes que nous avons rappelées au début de ce travail et dont les résultats ne sauraient être tenus pour satisfaisants. Par ailleurs, seule la somme : leucine + isoleucine, a la plupart du temps été dosée. Or, les travaux de Rose, Womack, Kemmerer, Merz, Gunther, Mac Coy et Meyer [144] et ceux de Rose [143] ont établi que la leucine et la valine sont indispensables à la croissance ; aussi un grand intérêt s'attache-t-il à la connaissance du taux de ces acides aminés dans une protéine.

Nous avons appliqué la méthode de dosage de la leucine et de la valine décrite dans le chapitre précédent à de nombreuses protéines, afin d'acquérir, d'une part, des données utiles à l'étude de leur composition, laquelle fournit, d'autre part, des renseignements intéressant la couverture du besoin de l'organisme en leucine et en valine par ces protéines. Nous pensions aussi que les teneurs en ces deux amino-acides pourraient constituer un élément de classification des protéines, au même titre que la pauvreté en glycocolle caractérise les albumines, un taux très élevé en acide glutamique les prolamines (31,3 p. 100 dans la zéine et 43,0 p. 100 dans la gliadine), et une grande richesse en arginine les protamines (87,4 p. 100 d'arginine dans la salmine) lesquelles sont, d'autre part, dépourvues d'acides dicarboxyliques.

Enfin, nous espérions que le taux des deux acides aminés étudiés traduirait la spécificité des chromoprotéides de divers animaux.

Bien que nos dosages aient porté sur des protéines appartenant à presque toutes les classes (albumines, globulines, prolamines, scléroprotéines, phosphoprotéides et chromoprotéi-

des), des recherches plus approfondies ont été faites sur le groupe des pigments respiratoires si important au point de vue physiologique.

Les pigments respiratoires se ramènent à deux types suivant que leur molécule renferme (hémoglobines, chlorocruorines) ou non (hémocyanines, hémérythrines) un groupement prosthétique tétrapyrrolique. La constitution des hémoglobines, définitivement établie par H. Fischer [66], est celle de combinaisons d'une globine à un groupement prosthétique porphyrique : le protohème, dérivé ferreux de la 1-3-5-8 tétraméthyl, 2-4 divinylporphine, 6-7 dipropanoïque. Les chlorocruorines ont un groupement prosthétique voisin du protohème, puisqu'un radical vinyl y est remplacé par un radical formyl (chlorocruorohème de H. Fischer et von Seemann : 1-3-5-8 tétraméthyl, 2 formyl, 4 vinylporphine, 6-7 dipropanoïque). Quant au groupement prosthétique des hémocyanines et des hémérythrines, on s'accorde à le considérer comme formé par un polypeptide renfermant du cuivre dans le cas des premières, du fer dans celui des secondes, Si le constituant protéique des pigments porphyriques est une globine, les données que nous avons sur celui des hémocyanines et des hémérythrines sont moins précises ; toutefois, ces deux protéines sont assez voisines si on tient compte de leurs compositions en acides aminés et de leurs propriétés physico-chimiques (point isoélectrique, précipitation par les sels neutres). On rencontre les hémoglobines non seulement chez les Vertébrés, mais encore chez quelques Invertébrés (*Lumbricus terrestris ; Arenicola marina* ; *Glycera convoluta*) ; aussi le second problème qui s'est posé a-t-il été celui de la *spécificité* de ces pigments, car on était en droit de se demander si deux hémoglobines appartenant à deux embranchements, à deux genres, ou même à deux espèces différentes pouvaient présenter les mêmes caractères physiques, chimiques et physico-chimiques.

La notion de spécificité repose sur l'observation de manifestations biochimiques variées : diversité des formes cristallines des hémoglobines et des hémocyanines, diversité des spectres des dérivés oxygénés ou oxycarbonés, étude cinétique du dédoublement des hémoglobines en hématine et globine (Haurowitz [78]) ou des hémocyanines en leurs deux constituants (Pirie [125]), enfin affinité variable pour l'oxygène ou l'oxyde de carbone (Barcroft, Nicloux [114]).

Le groupement prosthétique des hémoglobines étant iden-

tique dans tous ces chromoprotéides, il est certain, comme le dit J. Roche [136], que les bases biochimiques de la spécificité doivent être recherchées dans la partie protéique de la molécule : « L'étude du constituant protéique doit permettre d'établir la notion de spécificité sur des arguments tenant à la nature de ces corps et non plus seulement à leurs propriétés ». Les recherches d'ordre chimique (dosage des éléments, des acides aminés) ou physico-chimiques (spectre ultra-violet, point isoélectrique, détermination de la pression osmotique, ultracentrifugation) entreprises sur les hémoglobines (Schenck [146], Reinbold [132], Timar [166], Roche [136], Abderhalden [1], Vickery et Leavenworth [168], Roche [136], Roche et Dubouloz [138], Beach, Bernstein, Hummel, Williams et Macy [29], Vlès [169], Ray Lankester [130], Roche [136], Campbell et Poulton [44], Michaelis et Davidsohn [104], Glass [73], Straub et Meyer [160], Svedberg [162], Roche et Jean [139]) ont été par la suite poursuivies sur les hémocyanines (Hernler et Philippi [81-82]), Dhéré [49], Henze [80], van Slyke [159], Roche [136]), Svedberg [162] et sur les hémérythrines (Roche [136]). Ces travaux ont établi que les chromoprotéides présentent, suivant leur origine et leur localisation sanguine ou musculaire, des caractères particuliers traduisant leur spécificité. Si on s'en tient aux dosages des bases hexoniques (Roche [136], Roche et G. Jean [139]) et du soufre sous ses diverses formes (Timar [166], Beach [29], Birkofer et Taurins [34]) on constate des différences très importantes d'une globine à l'autre et entre hémocyanines de diverses espèces.

De plus, les pigments hémoglobiniques des Invertébrés contiennent une protéine différente de celle des hémoglobines des Vertébrés, ce qui justifie leur groupement en une classe particulière à laquelle Svedberg et Eriksson [163-164] ont donné le nom d'*érythrocruorines*.

Cette distinction en hémoglobines vraies et érythrocruorines avait été basée d'abord sur des différences de caractères physico-chimiques (Vlès [169], Ray-Lankester [130]). Les travaux de J. Roche [136] sur la composition en acides aminés de ces deux sortes de pigments hémoglobiniques ont confirmé cette classification. Cet auteur a comparé les teneurs en arginine, histidine et lysine de l'hémoglobine de Cheval avec celles de diverses érythrocruorines et celles de la chlorocruorine de Spirographe. Le premier de ces pigments est caracté-

risé par une teneur assez faible en arginine (3,57 p. 100), une teneur assez élevée en histidine (8,13 p. 100) et en lysine (8,31 p. 100) tandis que les érythrocruorines présentent un taux plus élevé en arginine (10,07 p. 100), plus faible en histidine (4,68 p. 100) et en lysine (1,73 p. 100), les quantités de ces acides diaminés rencontrées dans la chlorocruorine se rapprochant beaucoup des taux observés pour les érythrocruorines.

A la notion de spécificité doit s'en ajouter une autre, importante du point de vue physiologique, c'est celle de *plasticité* des protéines, mise en évidence par A. Roche [135]. Il faut entendre par ce terme l'aptitude que possède une molécule protéique à renouveler ou à remplacer certains de ses constituants en vue d'une adaptation physiologique passagère ou définitive. Haurowitz [77, 78] ayant montré la présence d'hémoglobines différentes chez le nouveau-né et chez l'adulte, on doit admettre qu'à des caractères spécifiques particuliers à chacune d'elles correspondent des nécessités physiologiques différentes, et que le passage d'une forme d'hémoglobine à une autre s'effectue grâce à la plasticité de ce chromoprotéide. Or, si la molécule protéique est douée d'une certaine plasticité, il faut penser qu'elle le doit soit à des remaniements de structure, soit au remplacement de quelques-uns de ses peptides par d'autres acides aminés dont la structure se rapproche assez de celle des premiers. Lorsqu'on envisage une modification telle que le passage de l'hémoglobine du nouveau-né à l'état d'hémoglobine d'adulte on peut concevoir, par exemple, que, la valine et la leucine, ayant une grande analogie de structure puisqu'elles possèdent toutes les deux un groupement isopropylique en bout de chaîne, peuvent se substituer l'une à l'autre dans une molécule protéique sans que les propriétés de celle-ci soient modifiées d'une manière importante. Ceci n'exclut pas la possibilité de substitutions plus poussées, les propriétés de la molécule pouvant demeurer très voisines au point de vue physicochimiques, puisqu'elles relèvent surtout des groupements polaires.

Les diverses globines présentent des caractères communs et des caractères spécifiques. On peut penser que les premiers dépendent de chaînes polypeptidiques fondamentales constituant une sorte de squelette de la molécule protéique, de structure et de composition identiques dans toutes les globines, tandis que les seconds seraient liés à la structure de chaînes

peptidiques plus simples greffées sur les premières. Ces chaînes peptidiques secondaires seraient responsables de la plasticité de la molécule protéique grâce au remplacement de certains de ses acides monoaminés acyliques par d'autres appartenant au même groupe. L'alanine étant un acide aminé dont les organismes animaux opèrent très facilement la synthèse, nous avons pensé qu'il pouvait être choisi comme type des monoacides monoaminés susceptibles de participer à de tels remaniements.

Ceci étant, nous avons entrepris des recherches sur la teneur en leucine, en valine et en alanine de plusieurs chromoprotéides (hémoglobines sanguines et musculaires de Mammifères ; érythrocruorines d'Annélides ; hémocyanines de Mollusques, de Crustacés et de Xiphosure) pour essayer d'apporter une contribution à l'étude de leurs caractères spécifiques basée sur des particularités de leurs compositions en ces acides aminés. A notre connaisance, il n'a pas été fait sur ce sujet d'étude systématique antérieure à la nôtre. Nous avons seulement relevé quelques données établies par Abderhalden [1] sur les teneurs en leucine et en valine des hémoglobines de Cheval et de Chien.

Dans une autre série de recherches, nous avons déterminé les taux de leucine et de valine dans divers euprotéides et dans un phosphoprotéide afin de comparer les valeurs obtenues par diverses méthodes avec celles fournies par la méthode décrite ici et d'en tirer les conclusions qui ont paru s'imposer.

I. — Teneur en leucine, en valine et en alanine des pigments respiratoires. Spécificité des chromoprotéides.

Matériel d'étude et techniques.

Notre matériel d'étude est composé de trois groupes de pigments hémoglobiniques nettement individualisés — à savoir : des hémoglobines sanguines, des hémoglobines musculaires de Vertébrés appartenant à diverses familles et une érythrocruorine sanguine d'Annélide — et de trois groupes d'hémocyanines : celles des Mollusques, celles des Crustacés et celle de la Limule (Xiphosure). Nous avons étudié des pigments provenant de chaque série, afin de disposer d'un ensemble de données

permettant la comparaison que nous nous proposions de faire.

Nos recherches ont porté sur dix-sept globines sanguines de Mammifères réparties de la façon suivante : trois globines de Bœuf (*Bos taurus*), quatre globines de Chien (*Canis familiaris*), deux globines de Cobaye (*Cavia cobaya*), deux globines de Cheval (*Equus caballus*), une globine d'Homme (*Homo sapiens*), deux globines de Lapin (*Lepus cuniculus*), deux globines de Mouton (*Ovis aries*) et une globine de Porc (*Sus domesticus*) ; sur trois globines musculaires de Mammifères : une de Bœuf, une de Chien et une de Cheval ; sur une globine d'érythrocruorine d'Annélide (*Arenicola marina*) ; sur six hémocyanines, dont quatre proviennent soit de Mollusques Céphalopodes (Poulpes : *Eledone moschata, Octopus vulgaris,* Seiche : *Sepia officinalis*), soit de Mollusques Gastéropodes (Escargot : *Helix pomatia*), une de Crustacé (Crabe commun : *Carcinus mœnas*) et la sixième d'un Xiphosure (Limule ou Crabe des Moluques : *Limulus polyphemus*), ce dernier étant l'unique représentant d'un groupe zoologique important en voie de disparition.

Les *globines* ont été préparées d'après la méthode décrite par Anson et Mirsky [**24**, **25**]. Celle-ci consiste à faire agir de l'acide chlorhydrique sur l'hémoglobine en présence d'acétone. Dans un premier temps de cette préparation on commence par laver les hématies à l'eau salée physiologique, on les laque ensuite par addition d'eau distillée et de 10 p. 100 de leur volume d'éther et on sépare les stroma globulaires par centrifugation et filtration. Dans un second temps, on ajoute à cette solution, glacée, le même volume d'une solution d'acide chlorhydrique N/10 également glacée, en agitant continuellement. L'acide agit en dédoublant l'hémoglobine en ses deux constituants fondamentaux : la globine d'une part, l'hématine d'autre part. L'opération est poursuivie jusqu'à ce qu'on ne décèle plus, au spectroscope, la bande de la méthomoglobine en dehors du spectre de l'hématine. A ce moment, on ajoute en un mince filet, toujours en agitant, dix fois le volume d'acétone chlorhydrique (acétone renfermant le centième, en volume, d'acide chlorhydrique N). Il n'y a plus qu'à recueillir la globine précipitée, à la laver avec de l'acétone pure et à la laisser sécher à l'air. Réduites à l'état de poudre fine les globines sont blanches, assez facilement solubles dans l'eau et ne renferment que de très faibles quantités de sels.

Les *globines musculaires* (myoglobines) ont été préparées à partir de cœur de Bœuf ou de Cheval, et de muscle squelettique de Chien, suivant une méthode décrite par J. Roche, Y. Derrien et H. Vieil [**140**] que nous pouvons résumer de la manière suivante : le tissu musculaire haché est mis à macérer dans 3 fois son volume d'eau à 0° pendant 12 heures. L'addition de SO_4 $(NH_4)_2$ en quantité correspondant à 85 p. 100 de la saturation de ce sel à 20° détermine d'abord la précipitation de protéines étrangères ; on

filtre et on enrichit le filtrat en $SO_4 (NH_4)_2$, ce qui provoque la précipitation de la myoglobine à l'état cristallisé. Par dissolution dans l'eau, transformation en méthémoglobine (par le ferricyanure de potassium) et élimination des sels par dialyse sous pression à 0° on purifie le pigment dont on isole ensuite la globine. La cristallisation, très facile à obtenir dans le cas de la myoglobine du Cheval, n'a lieu qu'exceptionnellement avec celles des autres animaux. Le pigment est alors purifié par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium jusqu'à ce que sa solubilité en présence de ce sel satisfasse à l'équation d'E. J. Cohn.

L'*érythrocruorine* d'Arénicole a été obtenue par J. Roche [**136**] d'après la technique qu'en donne cet auteur : ponction des vaisseaux pour recueillir le sang et dialyse prolongée dans un sac de collodion ce qui laisse de petites quantités d'une protéine qu'on sépare par centrifugation ; le pigment est précipité par $SO_4 (NH_4)_2$ et on le purifie par dialyse, suivie, si cela est nécessaire, de l'élimination de globulines par $SO_4(NH_4)_2$ à demi-saturation. Le produit obtenu présente alors une solubilité en présence de $SO_4(NH_4)_2$ obéissant à l'équation d'E. J. Cohn (Roche et Combette).

Les *hémocyanines* ont été préparées par J. Roche [**136**], par dialyse prolongée à 0° des sangs de Mollusques ou de Crustacés. Cette dialyse prolongée a pour effet de permettre la séparation de protéides mal déterminés, qui précipitent pendant les huit premiers jours en même temps que les sels s'éliminent. Le pigment ne commence à précipiter qu'à partir de la troisième semaine au minimum, au froid, mais il est possible de déclancher une précipitation plus rapide en amenant le pigment au voisinage de son point isoélectrique par addition d'HCl N/20 et en continuant la dialyse pendant quelques semaines. Ces pigments se présentent sous l'aspect d'une poudre gris-bleu ou verte suivant l'espèce animale qui l'a fournie.

Ce sont ces protéines que nous avons soumises à l'hydrolyse par SO_4H_2 6 N pour y doser la leucine, la valine et l'alanine par la méthode de Fromageot et Mourgue [71] pour les deux premiers, par celle de Desnuelle [48] pour l'alanine (mode opératoire de Dumazert [50] pour le dosage à l'échelle microanalytique).

Résultats expérimentaux.

Les résultats obtenus sont rapportés aux diverses hémoglobines ou aux érythrocruorines dans le cas des chromoprotéides hémoglobiniques. Nous les avons rassemblés dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII. — *Teneurs en leucine, en valine et en alanine p. 100 de divers pigments respiratoires.*

Nature, origine et localisation du pigment		Leucine p. 100	Valine p. 100	Alanine p. 100
Hémoglobines sanguines de Mammifères.				
Bos taurus	I	16,10	7,46	8,49
	II	15,22	8,71	8,91
	III	14,22	10,27	—
Canis familiaris	I	7,33	17,31	8,66
	II	16,61	6,61	6,36
	III	24,70	6,21	4,96
	IV	11,47	10,72	8,54
Cavia cobaya	I (*)	19,38	6,10	9,76
	II (*)	17,10	7,55	8,06
Equus caballus	I	19,15	9,92	8,93
	II	19,15	9,57	6,40
Homo sapiens		17,10	10,10	9,93
Lepus cuniculus	I (*)	17,06	8,68	3,13
	II (*)	21,60	6,88	6,44
Ovis aries	I	16,38	8,14	8,73
	II	17,74	7,66	9,21
Sus domesticus	I	15,78	9,66	6,68
Hémoglobines musculaires de Mammifères.				
Bos taurus (*)	I	13,92	4,11	9,29
Canis familiaris (*)	I	13,26	4,35	5,66
Equus caballus (*)	I	17,43	4,81	6,90
Erythrocruorine sanguine d'Annélide.				
Arenicola marina	I	9,68	6,69	—
Hémocyanines de Mollusques.				
Eledone moschata (*)	I	11,63	3,62	5,88
Helix pomatia (*)	I	9,17	7,64	3,82
Octopus vulgaris (*)	I	10,93	6,37	7,54
Sepia officinalis (*)	I	7,04	6,25	3,58
Hémocyanine de Crustacé.				
Carcinus moenas (*)	I	15,00	4,22	7,61
Hémocyanine de Xiphosure.				
Limulus polyphemus (*)	I	7,69	6,69	4,80

(*) Valeurs *moyennes* obtenues sur un échantillon contenant le pigment respiratoire d'un nombre de sujets, au moins égal à dix dans le cas des hémoglobines musculaires et pouvant atteindre plusieurs centaines dans le cas des hémocyanines et un millier au moins dans celui de l'érythrocruorine.

Discussion des résultats.

Ces résultats mettent en évidence plusieurs faits dont il y a lieu de discuter la signification à partir des valeurs expérimentales obtenues, tant en ce qui concerne la spécificité des chromoprotéides que leur composition.

L'examen du tableau VIII montre que chaque type de pigment manifeste son individualité par une teneur en leucine, en valine et en alanine particulières. C'est ainsi que le groupe des hémoglobines sanguines de Vertébrés se caractérise par des taux de leucine variant de 14,22 p. 100 à 21,6 p. 100 et des taux de valine compris entre 6,10 p. 100 et 10,7 p. 100, tandis que les hémocyanines de Mollusques sont caractérisées par une teneur assez constante en leucine (environ 10 p. 100) et en valine (environ 6 p. 100). Aussi allons nous examiner avec plus de détails les caractéristiques de chaque type de pigment respiratoire.

A. — Spécificité et composition des hémoglobines sanguines et musculaires.

Ces deux types de pigments hémoglobiniques présentent des différences marquées justifiant pleinement leur séparation. Le premier se caractérise par une teneur plus élevée en leucine (valeurs moyennes pour les hémoglobines sanguines de Bœuf : 15,18 p. 100, de Chien : 15,02 p. 100, de Cobaye : 18,24 p. 100 ; de Cheval : 19,15 p. 100, d'Homme : 17,10 p. 100, de Lapin : 19,33 p. 100, de Mouton : 17,06 p. 100, de Porc : 15,78 p. 100) et en valine (valeurs moyennes pour les hémoglobines sanguines de Bœuf : 8,81 p. 100, de Chien : 10,21 p. 100, de Cobaye : 6,82 p. 100, de Cheval : 9,74 p. 100, d'Homme 10,1 p. cent, de Lapin : 7,78 p. 100, de Mouton : 7,9 p. 100, de Porc : 9,66 p. 100). Le second présente des valeurs moyennes généralement plus basses en l'un et l'autre de ces deux acides aminés (leucine : 13,92 p. 100 dans la myoglobine de Bœuf, 13,26 p. 100 chez le Chien et 17,43 p. 100 chez le Cheval — valine : 4,11 p. 100 chez le Bœuf, 4,35 p. 100 chez le Chien et 4,81 p. 100 chez le Cheval). On trouve dans ces données une manifestation évidente de l'individualité de chaque type d'hémoglobine.

En nous plaçant au point de vue de l'espèce animale, on re-

connaît l'existence de différences marquées aussi bien dans le groupe des hémoglobines sanguines que dans celui des hémoglobines musculaires, même si l'on considère les pigments appartenant à des espèces animales d'un même ordre (par exemple les Ongulés : Cheval, Bœuf, Mouton et Porc ; les Rongeurs : Lapin et Cobaye). Nous avons essayé de systématiser ces différences en calculant le nombre de molécules-gramme de chaque acide aminé étudié présent dans une molécule-gramme de pigment, en nous basant sur le poids moléculaire de 68.000 pour les hémoglobines sanguines. Les valeurs moyennes obtenues sont rassemblées dans le tableau IX.

TABLEAU IX. — *Nombre de molécules-gramme de leucine, de valine et d'alanine présentes dans une molécule-gramme des diverses hémoglobines sanguines.*

Hémoglobine sanguine de	Molécules d'acide aminé par molécule d'hémoglobine		
	Leucine	Valine	Alanine
Bos taurus	80	52	68
Canis familiaris (1)	80	60	56
Cavia cobaya	96	44	68
Equus caballus	100	56	56
Homo sapiens	92	60	72
Lepus cuniculus	100	44	36
Ovis aries	88	44	68
Sus domesticus	80	52	52

Ce tableau met encore mieux en relief les différences observées d'une espèce animale à l'autre, mais il ne permet pas d'établir un classement des corps étudiés.

A l'échelle de l'espèce, exception faite pour le pigment de Cheval, nous constatons également des écarts parfois importants d'un échantillon à l'autre : 13,2 p. 100 pour la teneur en leucine des hémoglobines sanguines de Bœuf, 26 p. 100 pour celles de Lapin et enfin 238 p. 100 dans celles de Chien. Dans ce dernier cas, une telle disproportion dans la teneur en leucine peut surprendre au premier abord ; d'ailleurs, d'aussi grands écarts existent en ce qui concerne les taux de valine ou touchant les taux d'alanine. Le pigment sanguin

(1) Nous avons calculé des valeurs moyennes pour cette hémoglobine malgré les écarts observés dans les diverses préparations, en raison des possibilités de remplacement d'un acide aminé par l'autre dans la molécule discutées plus bas.

du Chien présente à ce point de vue un intérêt particulier et ce fait mérite d'être rapproché d'observations antérieures faites par Timar [166] et par Roche [136] sur la teneur en soufre des hémoglobines sanguines de Chien. Le premier de ces auteurs a constaté que le pigment sanguin de Chiens de race pure présente une teneur en soufre oscillant de 0,56 à 0,61 p. 100, tandis que le dosage de cet élément dans les hémoglobines de Chiens bâtards montre des écarts plus importants, de 0,48 à 0,69 p. 100. Dans aucun des autres pigments hémoglobiniques on observe un pareil décalage. J. Roche a confirmé ces données en expérimentant sur quatre échantillons provenant de chiens différents et fournit comme valeurs extrêmes : 0,46 et 0,61 p. 100. Signalons que les globines des autres Mammifères présentent une teneur en soufre assez fixe et particulière à chaque espèce. Etant donnée l'origine indéterminée des animaux utilisés, nous ne pouvons pas décider si les écarts observés chez une même espèce sont propres à une variété ou à un individu. Bien plus, l'existence de plusieurs hémoglobines dans le sang d'un même individu pouvant être envisagé (Roche, Derrien et Moutte [137]), il est impossible de préciser la cause de ces écarts.

TABLEAU X. — *Teneurs moyennes en leucine, valine et alanine p. 100 d'hémoglobines sanguines et musculaires et nombre de molécules-gramme des mêmes acides aminés présents dans une unité protéique de* Svedberg (17.000).

Hémoglobine	Teneur p. 100 en			Molécules d'acide aminé par unité de Svedberg (1)		
	Leucine	Valine	Alanine	Leucine	Valine	Alanine
Sanguine de Bœuf..	15,5	8,9	8,7	20	13	17
Musculaire de Bœuf	13,9	4,1	9,3	18	6	18
Sanguine de Cheval.	19,1	9,7	7,6	25	14	14
Musculaire de Cheval	17,4	4,8	6,9	22	7	13
Sanguine de Chien.	15,0	7,1	7,1	20	15	14
Musculaire de Chien	13,3	4,3	5,7	17	6	11

(1) Le poids moléculaire des hémoglobines musculaires étant de 17.000 (Pedersen, Roche et Vieil) et celui des pigments sanguins de 68.000 (Adair, Svedberg), nous avons cru devoir rapporter nos résultats à l'unité moléculaire de 17.000, bien que certains pigments sanguins, contenant 2, 3 ou 6 restes de cystine par molécule de 68.000, ne sauraient être constitués par quatre unités identiques.

La composition des hémoglobines musculaires se prête davantage à des comparaisons précises, entre elles et avec celle des hémoglobines sanguines. Les différences entre myoglobines portent davantage sur les taux d'alanine et de leucine que sur ceux de valine. Les données rassemblées dans le tableau X permettent ces comparaisons.

Le chromoprotéide musculaire se distingue du pigment sanguin chez les animaux de la même espèce par une teneur plus faible en leucine et surtout en valine, les teneurs en alanine étant très voisines. Il ressort de l'examen du tableau X qu'il existe des différences profondes dans la composition chimique des globines sanguines et musculaires d'une même espèce animale en ce qui concerne la leucine et la valine. Ces résultats corroborent entièrement ceux de J. Roche [136] et apportent une preuve de plus de la diversité des globines sanguines et musculaires.

B. — Spécificité et composition des pigments respiratoires d'Invertébrés (hémocyanines et érythrocruorines).

Les différences de composition des hémocyanines apparaissent aisément dans le tableau VIII pour les divers groupes zoologiques. Il y a même de très grands écarts dans la teneur en valine, en leucine et en alanine pour les trois représentants (Poulpes et Seiche) de l'embranchement des Mollusques (classe des Céphalopodes). Les observations générales faites au sujet des pigments hémoglobiniques conservent ici toute leur valeur : il existe des différences notables dans les teneurs en leucine, en valine et en alanine dans les divers types d'hémocyanines provenant d'animaux appartenant au groupe des Mollusques ou à celui des Crustacés. Afin de mieux les faire ressortir et montrer l'analogie qui existe entre l'érythrocruorine d'Arénicole et certaines hémocyanines de Mollusques, nous avons dressé le tableau XI. On trouvera réunies dans celui-ci les valeurs moyennes du nombre de molécules-gramme de leucine, de valine et d'alanine contenues dans une unité de Svedberg (17.000) des divers chromoprotéides étudiés.

Ici encore, les différences portent non seulement sur les deux types de pigments cuivriques propres aux Mollusques et aux Crustacés mais on les retrouve aussi à l'échelle de l'espèce, tout au moins pour les premiers puisqu'il ne nous a été

possible d'analyser qu'une hémocyanine de Crustacés. Nos résultats complètent donc et confirment les recherches d'Hernler et Philippi [81, 82], de Roche [136] sur la composition élémentaire et en acides aminés des hémocyanines à la suite desquels ces auteurs avaient établi une distinction entre les pigments des Mollusques et ceux des Crustacés. L'hémocyanine du seul Crustacé étudié est beaucoup plus riche en leucine que les autres.

TABLEAU XI. — *Nombre de molécules-gramme de leucine, de valine et d'alanine présentes dans une unité de* Svedberg (17.000) *de diverses hémocyanines et d'une érythrocruorine.*

Pigment	Molécules d'acide aminé par unité de Svedberg		
	Leucine	Valine	Alanine
Hémocyanine de :			
Eledone moschata (Mollusque)	16	5	11
Helix pomatia (Mollusque)	12	11	6
Octopus vulgaris (Mollusque)	14	9	14
Sepia officinalis (Mollusque)	9	9	7
Carcinus moenas (Crustacé)	20	6	15
Limulus polyphemus (Xiphosure)	10	10	9
Erythrocruorine d'			
Arenicola marina (Annélide)	12	10	—

Ce fait, qui la sépare nettement des hémocyanines de Mollusques, l'éloigne aussi du pigment respiratoire de la Limule ; du reste, non seulement les teneurs en leucine mais également les teneurs en valine et en alanine présentent une différence.

Les recherches de divers anatomistes avaient abouti à considérer le « Crabe fer à cheval » tantôt comme un Arachnide, tantôt comme un Crustacé, jusqu'au jour où Milne-Edwards, en 1872, dans une monographie sur l'anatomie de *Limulus polyphemus*, en fit le représentant d'une classe spéciale d'Arthropodes, celle des Mérostomates, montrant que l'appareil circulatoire d'une part, et le système nerveux d'autre part, s'écartaient de ceux de tous les Crustacés et de tous les Arachnides (Zittel [172]). Les travaux de J. Roche [136] ont déjà montré la différence qui existe entre le pigment de Limule et celui des Crustacés, basée sur les valeurs du point isoélectrique (6,30 pour le premier et 4,7 à 4,9 pour le second) et les te-

neurs en certains acides aminés (cystine, arginine et histidine).

La composition de l'érythrocruorine d'Arénicole est intéressante ; en effet, elle se rapproche de celle du pigment respiratoire des Mollusques par ses teneurs en leucine et en valine, tandisqu'elle s'éloigne du pigment hémoglobinique des Vertébrés. Or, une pareille observation s'était déjà imposée à la suite des travaux de Vlès, de Svedberg et de Roche, lesquels considèrent les érythrocruorines comme faisant partie d'un groupe particulier d'hémoglobines. Il apparaît donc que les pigments sanguins des Invertébrés présentent certaines analogies de composition de leur constituant protéique, même si l'on note des différences dans leur groupement prosthétique : la protohématine dans le cas des érythrocruorines, la chlorocruohématine dans le cas des chlorocruorines, l'hémocuprine dans le cas des hémocyanines et l'hémoferrine dans celui des hémérythrines.

C. — Constitution des protéines et teneur des chromoprotéides respiratoires en leucine, en valine et en alanine.

La teneur élevée en leucine, en valine et en alanine des protéines étudiées montre la participation importante de ces acides aminés à l'architecture moléculaire de ces corps. Deux problèmes peuvent être posés à ce sujet : le premier est celui de l'*équivalence* des divers acides monoaminés acyliques dans la structure de la molécule protéique. Le second est en rapport avec la théorie émise par Bergmann et Niemann [31] relative à la *fréquence* des acides aminés dans les protéines.

Comme nous l'avons vu, il existe parfois pour les animaux d'une même espèce des différences importantes dans les teneurs en leucine, en valine et en alanine des pigments respiratoires ; toutefois il est hors de doute que les échantillons de chromoprotéides les plus riches en leucine sont aussi les plus pauvres en valine et que la réciproque se vérifie également à partir des données établies plus haut. Cette constatation garde sa valeur quand on considère l'ensemble des pigments sanguins des Vertébrés, exception faite peut être pour l'hémoglobine sanguine de Cheval.

Tout se passe donc comme si la valine et la leucine, probablement grâce à leur analogie de constitution, étaient dans une certaine mesure interchangeables dans certains éléments

structuraux de la molécule protéique. Une sorte de compensation semble exister non seulement entre le taux de l'un et de l'autre de ces corps, mais aussi, quoique à un degré moindre, entre ces derniers et celui de l'alanine. Si on calcule le nombre de molécules-gramme de chaque acide aminé contenu dans une unité de SVEDBERG (17.000) à partir de nos résultats on peut dresser le tableau XII, qui met en évidence cette sorte de balancement pour les trois aminoacides acycliques étudiés :

TABLEAU XII. — *Nombre de molécules-gramme des sommes : leucine + valine et : leucine + valine + alanine, présentes dans une unité de* SVEDBERG (17.000) *de divers pigments respiratoires* (valeurs moyennes).

Pigment	Moléc. par unité de SVEDBERG		Pigment	Moléc. par unité de SVEDBERG	
	Leucine + Valine	Leucine + Valine + Alanine		Leucine + Valine	Leucine + Valine + Alanine
Hémoglobine sanguine de :			Hémocyanine de :		
Bos taurus	33	50	*Eledone moschata*..	21	32
Canis familiaris....	35	49	*Helix pomatia*	23	29
Equus caballus.....	39	53	*Octopus vulgaris*....	23	27
Cavia cobaya	35	52	*Sepia officinalis*....	18	25
Lepus cuniculus....	36	46	*Carcinus moenas*...	26	41
Ovis aries.....	33	50	*Limulus polyphemus*	20	29
Hémoglobine musculaire de :			Erythrocruorine d'*Arenicola marina*.	22	—
Bos taurus	24	42			
Canis familiaris....	23	34			
Equus caballus.....	29	42			

La comparaison des données figurant dans les tableaux IX, X et XII permet de saisir dans quelle mesure la leucine, la valine et l'alanine peuvent être considérées comme susceptibles de se substituer l'une à l'autre dans les chromoprotéides étudiés. Prenons, par exemple, la série des hémoglobines sanguines : les valeurs moyennes les plus basses du nombre de molécules-gramme de leucine, de valine et d'alanine s'écartent respectivement de 20,0 p. 100, de 26,6 p. 100 et de 50,0 p. 100 par rapport aux valeurs moyennes les plus élevées

(Tableau IX). Celles de la somme : leucine + valine ne diffèrent plus que de 15,4 p. 100 et enfin les écarts ne sont plus que de 13,2 p. 100 pour la somme : leucine + valine + alanine. Dans la série des hémocyanines de Mollusques les écarts sont plus importants ; ils atteignent 43,7 p. 100 pour la leucine, 54,6 p. 100 pour la valine et 57,1 p. 100 pour l'alanine en considérant les quatre espèces étudiées (tableau XI) (Poulpes, Seiche, Escargots). Ces écarts ne sont plus que de 21,7 p. 100 pour la somme : leucine + valine, et de 21,8 p. 100 pour la somme : leucine + valine + alanine.

Il est donc permis de penser que ces faits traduisent la possibilité d'un remplacement mutuel, partiel, de la leucine par son homologue inférieur la valine et peut être la substitution partielle de l'un d'eux par l'alanine dans certaines chaînes peptidiques d'une même molécule protéique. Ces substitutions ont probablement lieu dans ces chaînes peptidiques simples que nous avons qualifiées plus haut de secondaires et sur lesquelles porterait la plasticité de la molécule protéique. Le remplacement de la leucine par la valine peut, sans doute, être contrôlé par la constance dans la molécule protéique du nombre de groupements isopropyls, apportés par l'un ou par l'autre. Quant au facteur d'équivalence de l'alanine d'une part, de la leucine et de la valine d'autre part il ne peut être recherché que dans le groupement α aminé et il serait à cet égard intéressant d'avoir des documents précis sur le taux de ces chromoprotéides en glycocolle. Il est certains que de telles substitutions ne *sauraient porter que sur une partie de chaque acide aminé présent dans la protéine, car les chaînes polypeptidiques fondamentales ont nécessairement une composition fixe.* Ces substitutions partielles traduisent les différences spécifiques relevées dans la valeur des sommes : leucine + valine d'une part, et leucine + valine + alanine, d'autre part, entre les hémoglobines des diverses espèces, l'érythrocruorine et les hémocyanines des différents animaux.

Enfin, nous basant sur les travaux de Bergmann [30], Bergmann et Niemann [31], nous avons calculé la fréquence des acides aminés étudiés dans les diverses hémoglobines sanguines. Astbury [26] avait montré la possibilité d'existence d'une périodicité pour les acides aminés et, à partir d'analyses faites sur la gélatine par divers auteurs, émis l'opinion que l'on pouvait considérer que chaque troisième acide aminé devait être du glycocolle et chaque neuvième de l'hydroxyproline dans cette protéine.

Les premiers essais de Bergmann et de Niemann ont porté sur la gélatine et se sont étendus par la suite à d'autres protéines. L'intérêt de ces travaux est de permettre de déterminer par voie chimique le poids moléculaire minimum d'une protéine avec une précision satisfaisante. Sans entrer dans le détail complet des expériences réalisées, rappelons qu'après avoir dosé le plus grand nombre possible d'acides aminés et calculé leur taux en molécules-gramme, déterminé le poids moléculaire moyen de tous les acides aminés et leur taux moyen, Bergmann et Niemann peuvent obtenir : 1° la fréquence de chacun des acides aminés dans la protéine, soit la proportion des divers acides aminés dans la protéine ; 2° leurs périodicités ; 3° le poids moléculaire de la protéine utilisée, car le produit de la fréquence par la périodicité donne le nombre total de molécules d'acides aminés et il suffit de multiplier ce nombre par le poids moléculaire moyen de ceux-ci (diminué de 18, poids moléculaire de l'eau fixée lors de la rupture de chaque liaison peptidique) pour obtenir le poids moléculaire cherché. Le nombre total des acides aminés répond toujours à l'expression : $2^n \times 3^m$ (n et m = nombres entiers), la fréquence et la périodicité de chaque acide aminé étant des valeurs de $2^{n_1} \times 3^{m_1}$ (n_1 et m_1 = zéro ou nombre entier).

Bergmann et Niemann ont, par la suite, adopté une formule permettant de calculer la périodicité d'un acide aminé à l'aide d'une formule dans laquelle la fréquence F exprime la périodicité telle qu'elle était initialement définie. Dans cette formule :

$$\frac{F \times Mm}{M} = \frac{100}{A.a.\%},$$

F = fréquence de l'acide aminé (initialement périodicité),
Mm = poids moléculaire moyen des acides aminés présents dans la protéine,
M = poids moléculaire de l'acide aminé dont on calcule F,
A. a. % = pourcentage de l'acide aminé.

Ainsi considérée, la fréquence définit l'intervalle séparant deux molécules d'un même acide aminé dans une protéine en fonction du nombre de molécules d'autres acides aminés intermédiaires. Par exemple, l'hémoglobine sanguine de Chien contenant 3 molécules de cystéine, la fréquence de cet acide aminé est de 192, d'après Bergmann et Niemann, un reste de cystéine étant séparé d'un autre reste de cystéine par 191 restes d'autres acides aminés. On trouvera dans le tableau XIII

les données moyennes établies dans ce domaine par BERGMANN et NIEMANN et à partir de nos résultats sur les hémoglobines sanguines les mieux connues.

TABLEAU XIII. — *Fréquence des divers constituants des hémoglobines sanguines de Bœuf, de Cheval, de Chien et de Mouton.*

Constituant du pigment	Fréquence dans l'hémoglobine de :			
	Bœuf	Cheval	Chien	Mouton
Cystéine [32]	192	288	192	96
S non cystéique [32]	—	96	96	48
Arginine [32]	48	48	48	48
Histidine [32]	18	18	18	18
Lysine [32]	16	16	16	16
Alanine	6	8	8	6
Leucine	8	6	8	6
Valine	12	10	10	14

Ces données ne sauraient être qu'approchées et, de ce fait, le calcul ne peut pas être tenu pour rigoureux. Dans le cas des hémoglobines sanguines, il est certain que la molécule de ces pigments considérée comme ayant un poids moléculaire de 68.000 n'est pas constituée par l'association de quatre unités de SVEDBERG identiques. En effet, on trouve, par exemple, deux restes de cystéine et six atomes de soufre non cystéique dans le pigment du Cheval, trois restes de cystéine et six atomes de soufre non cystéique dans le pigment du Chien, six restes de cystéine et douze atomes de soufre non cystéique dans le pigment du Mouton, bien que ces trois pigments renferment d'une manière indiscutable quatre atomes de fer chacun.

Il est évident que BERGMANN et NIEMANN considèrent la molécule protéique comme un ensemble homogène, la répétition de tous les acides aminés se faisant régulièrement, comme si les acides aminés étaient placés à la suite les uns des autres dans un ordre caractérisé par leurs fréquences. C'est là une hypothèse ; la répartition des molécules d'acides aminés peut être considérée comme variable et rien ne s'oppose à ce que les restes de diacides monoaminés (acides glutamique, aspartique) ou d'acides thioaminés ou de bases hexoniques soient les points de départ de chaînes secondaires plus ou moins complexes. L'analyse des peptides simples, détachés graduellement de la molécule protéique donnerait de précieux renseignements sur leur composition, peut être sur la position de nombreux

acides aminés, et, partant, sur la structure moléculaire des protéines.

Néanmoins, les données rassemblées dans les divers tableaux traduisent avec netteté plusieurs faits sur lesquels l'examen des résultats expérimentaux avait déjà attiré notre attention, à savoir : l'importance, au point de vue quantitatif, des trois acides monoaminés étudiés, la spécificité de composition des chromoprotéides et la substitution possible d'un des corps par l'autre dans la molécule protéique (plasticité). A ce dernier point de vue, on remarquera, en se reportant au tableau XIII, que la somme des fréquences de la leucine, de la valine et de l'alanine est égale à 26 dans les pigments de Bœuf, de Mouton et de Chien, et à 24 dans celui de Cheval malgré des fréquences individuelles variables pour chaque acide aminé chez ces espèces. Il semble que ces trois corps soient répartis dans la molécule protéique suivant deux fréquences : l'une qui dépend de chaque acide aminé et lui est propre, l'autre qui dépend de leur ensemble.

II. — Teneur en leucine et en valine de divers Euprotéides et d'un Phosphoprotéide.

Matériel d'étude.

La plupart des produits étudiés ont été préparés ou purifiés au laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille par les méthodes suivantes :

Crystalbumine de sèrum de Cheval : cristallisation fractionnée à un pH voisin de 4,8 et pour des teneurs en sulfate d'ammonium comprises entre 50 et 56 p. 100 de la saturation en ce sel (technique de Y. Derrien).

Pseudoglobuline de sérum de Cheval (fraction II) : Précipitation fractionnée des pseudoglobulines à la lumière des données acquises pour l'établissement de leur courbe de solubilité dans des milieux de teneur croissante en sels (sulfate de sodium) (Technique de Y. Derrien).

Thyroglobuline : préparation suivant la technique de Harrington et Salter [**76**] : hâcher à froid les corps thyroïdes, recevoir dans une solution froide renfermant 1 p. 100 de NaCl et ajustée à pH = 8,0 ; agiter pendant trois heures, centrifuger, recueillir l'extrait aqueux dont on précipite la thyroglobuline en amenant le pH au voisinage du point isoélectrique (4,8) par de l'acide acétique à 20 p. 100. Purification par redissolution, après lavage du précipité, dans une solution à pH = 8,0, reprécipitation à pH = 4,8.

Gliadine du blé : méthode d'Osborne [**115**] : extraction par l'alcool à 70 p. 100 en volume, précipitation par addition d'eau froide, redissolution dans l'alcool,reprécipitation par l'eau, traiter par l'alcool fort et l'éther afin de délipider et de permettre une meilleure dessiccation.

Zéine du maïs : méthode d'Osborne [**115**] extraction par l'alcool tiède à 80-90 p. 100 en volume, précipitation par l'eau froide, redissolution dans l'alcool à 80 p. 100 en volume, reprécipitation par l'eau, dégraisser par un mélange alcool + éther d'abord, par l'éther ensuite et sécher.

Fibroïne de soie de Provence. Préparée à partir d'un échantillon de soie brute adressé par les Etablissements Bouscarle et Cie, de Sorgues, Vaucluse. Traitement de la soie brute par chauffage à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes en milieu aqueux, lavages répétés à l'eau chaude, macération dans une solution chlorhydrique à 1 p. 100 pendant 24 heures, répétée le jour suivant, lavage à l'eau, macération dans l'alcool, lavage à l'éther et séchage.

Kératine de cheveux humains. Traitement semblable à celui adopté pour la fibroïne.

Ovalbumine de Poule ; d'après la technique donnée par Abderhalden [**5**] : On prépare une solution aqueuse d'albumines de l'œuf qu'on filtre et à laquelle on ajoute $SO_4(NH_4)_2$ jusqu'à demi-saturation, ce qui fournit un précipité d'ovoglobuline ; On filtre et on sature le filtrat en sulfate d'ammoniaque, ce qui précipite l'ovalbumine que l'on purifie par précipitation répétée, dialyse et précipitation par l'alcool.

Fibrine ; d'après la technique décrite par Abderhalden [**5**] : Lavage des caillots de fibrine avec H_2O, ensuite avec des solutions de NaCl à 6 p. 1.000 et 10 p. 100, d'ammoniaque à 0,02 p. 100 et avec de l'eau distillée.

On trouvera ci-dessous la liste de tous les produits analysés, à laquelle nous avons joint les indications complémentaires sur l'origine des protéines étudiées et leur teneur en azote total p. 100 du produit sec. Cette dernière détermination a été réalisée par microkjeldahl sur des échantillons desséchés à 105°, suivant la technique de minéralisation donnée par Dumazert et Marcelet [51] (minéralisation sulfurique en présence de sélénite de mercure).

a) *Caséine* de Vache (Hoffmann-La Roche), N p. 100 = 13,60.

b) *Crystalbumine* de sérum de cheval (préparée au laboratoire), N p. 100 = 15,8.

c) *Edestine* (Hoffmann-La Roche), N p. 100 = 18,50.

d) *Elastine* (collection du laboratoire origine inconnue), N p. 100 = 15,80.

e) *Fibrine* de Cheval (préparée au laboratoire), N p. 100 = 15,82.

f) *Fibroïne* de soie de Provence (préparée au laboratoire) N p. 100 = 16,80.

g) *Gélatine* (Rhône-Poulenc), N p. 100 = 17,37.

h) *Gliadine* du blé (préparée au laboratoire), N p. 100 = 17,60.

i) *Kératine* de cheveux humains (préparée au laboratoire), N p. 100 = 16,90.

j) *Ovalbumine* de Poule (préparée au laboratoire), N p. 100 = 15,32.

k) *Osséine* (Coignet), N p. 100 = 15,60.

l) *Pseudoglobuline* de sérum de Cheval (préparée au laboratoire), N p. 100 = 16,00.

m) *Thyroglobuline* de Bœuf (préparée au laboratoire), N p. 100 = 13,20.

n) *Zéine* (échantillon I préparé au laboratoire, échantillon II de la maison Schwanfeld et Cie), N p. 100 = 15,52 (I)
N p. 100 = 15,90 (II)

Résultats expérimentaux.

On trouvera dans le tableau XIV ci-dessous les résultats (moyennes) obtenus dans la plupart des cas sur deux hydrolysats.

TABLEAU XIV. — *Teneurs en leucine et en valine de diverses protéines.*

Protéine		Leucine p. 100	Valine p. 100
A. Euprotéines			
Albumines	Crystalbumine (Cheval)	16,1	—
	Ovalbumine	13,5	3,7
Globulines	Edestine	6,5	6,4
	Fibrine	11,3	2,6
	Pseudoglobuline (Cheval)	28,9	18,1
	Thyroglobuline (Bœuf)	12,8	1,4
Prolamines	Gliadine	6,9	3,7
	Zéine	29,4	2,2
Scléroprotéines	Elastine	17,2	12,5
	Fibroïne	1,17	4,3
	Gélatine	6,7	1,3
	Kératine (cheveux humains)	19,2	1,8
	Osséine	4,3	2,9
B. Phosphoprotéine			
	Caséine (*)	16,2	4,5

(*) Valeur calculée pour N p. 100 = 15,6.

Comme il est aisé de s'en convaincre par le simple examen du tableau XIV, les valeurs que nous obtenons sont parfois très différentes de certaines, déterminées par d'autres méthodes moins spécifiques dont nous avons fait la critique, et parmi lesquelles il est impossible de faire un choix.

Discussion des résultats.

Les résultats obtenus permettent d'établir une comparaison entre les divers groupes de protéines d'une part, entre ces données et celles fournies par plusieurs auteurs sur les mêmes protéines d'autre part, et d'en dégager certains faits utiles soit à la classification des protéines, soit à leur valeur biologique.

La teneur en leucine et en valine apparaît comme très inégale dans les diverses protéines étudiées et il n'est pas possible de la considérer comme un élément utile à la classification de ces corps. En effet, si nous prenons comme exemple le groupe des globulines, nous constatons des écarts très grands entre les quatre protéines soumises à l'analyse. La pseudoglobuline de Cheval renferme un taux plus élevé que les autres en groupement isopropylique puisque la somme : leucine + valine y est égale à 47,0 p. 100, soit près de la moitié de la molécule. Dans le groupe des prolamines nous trouvons aussi des taux de leucine très variables en passant de la gliadine du blé à la zéine ; mais c'est dans le groupe des sclératoprotéides que les divergences entre les divers représentants sont les plus marquées. La séparation en protéines animales et en protéines végétales n'est pas, non plus, justifiée si on s'en tient essentiellement aux taux de leucine et de valine.

Il convient toutefois de souligner que, dans l'ensemble, les protéines sont plus riches en leucine qu'en valine, certaines d'entre elles (pseudoglobuline, zéine) renfermant jusqu'à près de 30 p. 100 de la première. Seule, parmi toutes ces protéines, la fibroïne fait exception par sa teneur plus grande en valine qu'en leucine.

Il n'est pas sans intérêt de comparer nos propres résultats et ceux obtenus par d'autres auteurs, que nous avons fait figurer dans un tableau au début de ce travail. D'une manière générale les teneurs en leucine que nous trouvons sont plus faibles pour l'édestine (6,5 p. 100 contre 8,1 p. 100, 12,9 p. 100 et 15,5 p. 100), la fibrine (11,3 p. 100 contre 13,0 p. 100 et 15,0 p. 100) et l'élastine (17,2 p. 100 contre 21,38 p. 100), que celles

trouvées par divers auteurs. D'autres sont sensiblement équivalentes (6,7 p. 100 contre 6,8 p. 100 et 7,1 p. 100 dans la gélatine ; 6,9 p. 100 contre 6,0 p. 100 et 6,6 p. 100 dans la gliadine). Enfin, nos dosages de la leucine indiquent par contre une teneur en leucine plus élevée que l'on ne l'a dmis jusqu'ici pour la zéine (29,4 p. 100 contre des valeurs s'échelonnant de 11,0 p. 100 à 22,4 p. 100), la caséine (16,2 p. 100 contre 7,9 p. 100 et 10,5 p. 100), la kératine (19,2 p. 100 contre 12,1 p. 100, 15,00 p. 100 et 18,3 p. 100).

Les différences touchant aux taux de valine sont parfois très grandes. Tandis que pour la gélatine on ne trouve pas de donnée relative à cet acide aminé et que Dakin n'a pu en isoler à partir de cette protéine, nous en trouvons 1,3 p. 100. La seule valeur, indiquée dans la bibliographie, relative à la caséine correspond au taux de 0,69 p. 100 et nous en trouvons 4,5 p. 100. De même, pour l'ovalbumine, le seul taux classique est de 2,5 p. 100, donc inférieur à celui que nous avons déterminé : 3,7 p. 100. Quant à l'élastine, le résultat obtenu est très différent de la seule valeur relevée : 12,5 p. 100 par notre méthode contre 1,0 p. 100 (Abderhalden et Schittenhelm [17]), les teneurs en leucine déterminées par ces auteurs et les nôtres étant par contre assez voisines (17,2 et 21,3 p. 100).

Le fait que, dans l'ensemble, les protéines sont riches en leucine présente un intérêt en ce qui concerne la couverture du besoin alimentaire en celle-ci, puisqu'on peut prévoir que ce besoin sera satisfait quelle que soit la nature de la protéine envisagée. Par contre, la valine se révèle comme un des acides aminés dont la majorité des protéines est pauvre. Or, considérée par Rose et ses collaborateurs comme indispensable à la croissance, la valine doit être apportée par le régime à un taux minimum. Ce taux paraît être très bas. En effet, si l'on adjoint à de la zéine, contenue dans la proportion de 18 p. 100 dans un aliment de base, de très faibles quantités de tryptophane et de lysine (Osborne et Mendel) la croissance du Rat est normale. Néanmoins on peut se demander si la leucine alimentaire ne peut pas constituer une source de valine comme l'homocystéine constitue une source de cystéine. Dans un cas comme dans l'autre, l'organisme animal pourrait produire un acide aminé à partir de son homologue supérieur. Seules des expériences faites avec des mélanges d'acides aminés purs permettront de répondre à cette question.

Conclusions du chapitre II.

I.

L'étude des teneurs en leucine, en valine et en alanine d'hémoglobines sanguines et musculaires de diverses espèces de Vertébrés, d'une érythrocruorine d'Annélide et d'hémocyanines provenant soit de Mollusques, soit d'Arthropodes, nous a permis les conclusions suivantes :

1° Les hémoglobines sanguines des divers Mammifères présentent des différences de teneur en leucine, en valine et en alanine qui traduisent leur spécificité. Le pigment respiratoire du Chien offre à cet égard une composition très variable, qu'il y a lieu de rapprocher des écarts observés pour sa teneur en soufre total. L'érythrocruorine d'Arénicole est moins riche en leucine que l'hémoglobine des Vertébrés ce qui apporte une nouvelle justification à la séparation des pigments hémoglobiniques des Invertébrés en un groupe particulier de chromoprotéides hématiniques (érythrocruorines).

2° Les hémoglobines musculaires sont généralement plus pauvres en leucine, et surtout en valine, que les pigments hémoglobiniques sanguins des animaux de même espèce.

3° Les hémocyanines des divers animaux présentent des teneurs variables en leucine, en valine et en alanine, ce qui justifie la séparation de ces pigments en plusieurs types suivant le groupe zoologique considéré, et met en relief la spécificité de leur constituant protéique.

4° Le nombre important des molécules de leucine, de valine et d'alanine et leur fréquence (Bergmann et Niemann) dans les pigments respiratoires permet d'envisager comme possible la périodicité de la répartition de ces acides aminés dans les protéines. Les résultats obtenus suggèrent la possibilité d'une substitution partielle de ces acides aminés l'un à l'autre dans la molécule protéique, et plus particulièrement le remplacement de la leucine par la valine (ou inversement), lesquelles possèdent toutes les deux un groupement isopropylique en bout de chaîne.

II.

1° Nous avons dosé la valine et la leucine dans plusieurs protéines et celles-ci se sont toujours montrées plus riches en leucine qu'en valine, exception faite pour la fibroïne.

2° Ces recherches nous ont permis d'apporter un complément de données relatives au taux de la valine dans quelques protéines et de préciser les teneurs en leucine et en valine de divers types de protéine (albumines, globulines, prolamines, scléroprotéines, phosphoprotéines), sans toutefois mettre en évidence une homogénéité à cet égard chez les représentants d'un même type (globulines ou scléroprotéines diverses par exemple).

CHAPITRE III.

HYDROLYSE CHIMIQUE OU ENZYMATIQUE DES PROTÉINES, RÉACTIVITÉ DES GROUPEMENTS ISOPROPYLIQUES DE LA LEUCINE ET DE LA VALINE ET LIBÉRATION PROGRESSIVE DE CES ACIDES AMINÉS.

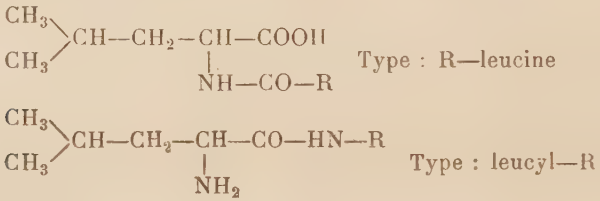
La mise en liberté de la leucine et de la valine au cours de l'hydrolyse des protéines par des agents chimiques (acides, bases) ou des enzymes pose plusieurs problèmes.

Le premier concerne la position de la leucine et de la valine dans les protéines. Nous avons vu que les taux de ces acides aminés dans les protéines sont très divers et que les teneurs en leucine sont presque toujours plus importantes que celles en valine. Nous pouvons nous demander si chacun de ces acides aminés est réparti d'une manière régulière dans les chaînes polypeptidiques ou s'ils occupent tous deux une position périphérique (en bout de chaîne polypeptidique) ou plus interne, ou encore si l'un n'occupe pas seulement une position périphérique, l'autre participant seul à la constitution du « noyau » de KOSSEL. Le second problème qui mérite d'être envisagé est celui de l'identité ou de la diversité des positions de la leucine et de la valine dans différentes protéines. Le dosage de la leucine et de la valine, ou plus exactement la détermination des quantités d'acétone formées par leur oxydation sous pression (*a*) ou directe (*b*), aux divers temps de l'hydrolyse des protéines nous a donc paru offrir un intérêt en ce qui concerne l'étude de la position de ces acides aminés dans les molécules protéiques.

Nous devons tout d'abord apporter ici quelques précisions touchant ces dosages et l'interprétation des résultats que nous espérions pouvoir en donner. En effet, l'hydrolyse acide ou alcaline libère tout d'abord, en dehors de très petites quantités d'acides aminés, des peptones de poids moléculaire assez élevé et, l'action des agents chimiques se poursuivant, on arrive au stade ultime d'acides aminés en passant par celui de polypeptides de plus en plus simples. La leucine et la valine contribuent à la constitution de ces polypeptides ; toutefois, on

peut prévoir que l'emplacement de l'un ou de l'autre acide aminé peut être très différent. Nous pouvons donc nous demander comment vont se comporter les groupements isopropyliques engagés dans des peptides de leucine et de valine au moment de l'oxydation chromique sous pression ou directe. En d'autres termes, il nous a paru indispensable, afin de discuter et d'interpréter nos résultats, de chercher à préciser si le groupement isopropylique de la leucine engagée dans un polypeptide fournit ou non le même rendement en acétone que la leucine libre, cette recherche intéressant également les peptides de valine.

Dans ce but, nous avons d'abord déterminé, à partir de polypeptides connus, le rendement en acétone du groupement isopropylique de l'un ou l'autre de ces acides aminés engagé dans les di ou tripeptides appartenant aux types R-leucine ou R-valine et leucyl-R ou valyl-R :



A la lumière des faits acquis, nous avons abordé l'étude de l'hydrolyse acide ou alcaline de diverses protéines.

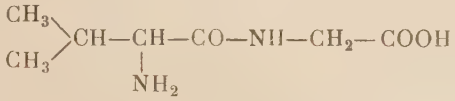
A. — Rendement en acétone du groupement isopropylique de la leucine et de la valine engagées dans les polypeptides.

Nos recherches ont porté sur cinq polypeptides appartenant aux deux types : la leucyl-tyrosine, la valyl-glycine et la leucyl-glycyl-glycine d'une part, la glycyl-leucine et la glycyl-valine d'autre part. Les uns proviennent des Laboratoires Hoffmann-La Roche, les autres (valyl-glycine et glycyl-valine) ont été préparés par le professeur C. Fromageot, que nous remercions très vivement de nous les avoir adressés en vue de ce travail. Leur pureté a été contrôlée par le dosage de l'azote et par celui de la leucine et de la valine après hydrolyse sulfurique.

Dans un premier temps de l'expérience, nous désaminons le polypeptide dans les conditions fixées pour le dosage de la leucine et de la valine et, dans un second temps, nous oxydons

le dérivé hydroxylé pour recueillir et doser l'acétone formée. Sans entrer dans le détail des opérations relatives aux cinq peptides analysés, nous citerons, à titre d'exemple, le détail des essais poursuivis sur la valyl-glycine.

Exemple : Valyl-glycine, P.M. = 174



Prise d'essai : 31,2 mg. de dipeptide
Acétone sous-pression, (*a*) : 1,08 mg.
Acétone directe, (*b*) : 0,46 mg.

100 mg. de dipeptide peuvent donner naissance théoriquement (100 p. 100) à 33,33 mg. d'acétone.

Sous-pression

Rendement normal, si le peptide était hydrolysé (coefficient de la valine 61,1 p. 100) ..... $\frac{33,33 \times 61,1}{100} = 20,36$ mg.

Trouvé ..... $1,08 \times 3,26 = 3,46$ mg.

Rendement par rapport au normal ..... $\frac{3,46 \times 100}{20,36} = 17,0$ p. 100

Directe

Rendement normal, si le peptide était hydrolysé (coefficient de la valine 69,0 p. 100) ..... $\frac{33,33 \times 69}{100} = 22,99$ mg.

Trouvé ..... $0,46 \times 3,26 = 1,49$ mg.

Rendement par rapport au normal ..... $\frac{1,49 \times 100}{22,99} = 6,4$ p. 100

TABLEAU XV. — *Rendement moyen en acétone de l'oxydation chromique de peptide contenant de la leucine et de la valine et augmentation de celui-ci après hydrolyse.*

Polypeptide	Rendement en acétone p. 100 de celui donné par la leucine et la valine libres.		Augmentation du rendement en acétone après hydrolyse acide totale, en p. 100 de celui donné par la leucine et la valine libres.	
	Oxydation sous-pression (*a*)	Oxydation directe (*b*)	Oxydation sous-pression (*a*)	Oxydation directe (*b*)
Leucyl-tyrosine	40,6	19,9	59,4	80,1
Leucyl-glycyl-glycine ...	28,4	20,5	71,6	79,5
Valyl-glycine	17,0	6,4	83,0	93,6
Glycyl-leucine	7,7	6,5	92,3	93,5
Glycyl-valine	3,0	3,5	97,0	96,5

Le tableau XV fournit les rendements en acétone des peptides étudiés.

Il ressort de l'examen des résultats figurant dans ce court tableau :

1° Que les peptides de leucine ont des rendements systématiquement supérieurs à ceux de la valine.

2° Que les rapports : rendement sous-pression/rendement direct (a/b) ont une valeur peu différente de 1 dans le cas des peptides du type R-leucine ou R-valine ; que ces rapports ont des valeurs toujours supérieures à 1,38 quand il s'agit de peptides du type leucyl-R ou valyl-R.

3° Que, dans le cas des peptides du type R-leucine ou R-valine dont les groupements $-NH_2$ de l'aminoacide intéressant sont bloqués, les rendements en acétone sont toujours minimes, ce qui confirme la nécessité de désaminer la leucine ou la valine quand on veut obtenir la transformation de leur groupement isopropylique en acétone.

4° Etant donnée la grande divergence entre les rendements, il est impossible d'appliquer les formules donnant x et y, donc de calculer les taux réels de leucine et de valine à un moment quelconque de l'hydrolyse, sauf si celle-ci est totale. Toutefois, il est possible d'effectuer des prélèvements à des temps variables de l'hydrolyse, de doser à partir de chacun l'acétone sous pression (a) et l'acétone directe (b), de suivre ainsi la libération des groupements isopropyliques totaux et d'en tirer des conclusions basées sur la valeur du rapport : acétone sous pression/acétone directe.

En effet, le rendement en acétone sous pression (a) est *au moins* une fois et demi plus élevé que celui obtenu par oxydation directe (b) pour les polypeptides de forme leucyl-R ou valyl-R ; la valeur du rapport a/b est alors supérieure à 1,4, tandis qu'elle est sensiblement égale à 1,0 dans le cas des polypeptides de la forme R-leucine ou R-valine. Par conséquent, pendant les premières étapes de l'hydrolyse où il existe surtout des polypeptides, il sera possible d'avoir une indication sur la nature du peptide dominant en se basant sur la valeur du rapport a/b.

D'autre part, la valeur du rapport a/b est de 1,8 dans le cas de la leucine pure ; elle est seulement de 0,9 pour la valine pure. Aussi la comparaison de la valeur de ce rapport à un temps donné de l'hydrolyse et après hydrolyse totale doit-elle

renseigner sur les constituants qui prédominent dans un mélange de polypeptides de leucine ou de valine renfermant ou non ces acides aminés libres.

B. — Hydrolyse acide ou alcaline de diverses protéines.

Les considérations précédentes permettent d'aborder l'étude de l'hydrolyse acide ou alcaline de quelques protéines avec l'espoir de tirer des résultats expérimentaux des renseignements assez précis sur la position de la leucine et de la valine dans la molécule protéique. Accessoirement, nous avons fait porter nos recherches sur la fraction des hydrolysats non précipitée par l'acide phosphotungstique, réactif dont l'usage permet l'élimination des protéines et de polypeptides de poids moléculaire assez élevé et d'acides aminés basiques non générateurs d'acétone.

Matériel d'étude et techniques.

Le matériel d'étude est constitué par une globine de Lapin, la zéine, l'édestine et la caséine. Les deux premières protéines ont été préparées au laboratoire suivant les méthodes décrites dans l'un des chapitres précédents, les deux autres proviennent de la maison Hoffmann-La Roche.

La technique d'hydrolyse acide, très simple, consiste à placer 500 mg. de la protéine à étudier dans un petit ballon en verre Pyrex avec 10 cm^3 d'acide sulfurique 6 N et à hydrolyser sous réfrigérant à reflux, en maintenant une légère ébullition, pendant des temps variables. Après élimination d'une partie de l'acide sulfurique par la baryte, à chaud, et lavage du précipité, on porte à un volume connu (250 cm^3) et l'on dose l'acétone sur une fraction aliquote, d'abord par oxydation sous pression, ensuite par oxydation et distillation directe. Dans le cas de l'hydrolyse alcaline on emploie une lessive de soude 6 N.

Quant au réactif phosphotungstique, il a été mis en œuvre dans les conditions classiquement adoptées (Fischer [59], Plimmer [126]).

Résultats expérimentaux.

Nous exprimons les résultats en acétone pour cent de protéine (a = acétone sous pression, b = acétone par oxydation et distillation directe) et en pour cent d'acétone libérée (A et B) par rapport à l'acétone totale obtenue en fin d'hydrolyse (leucine et valine libres). A titre documentaire, nous avons calculé, au moyen des formules permettant de connaître les taux de leucine et de valine, les taux d'acétone qui leur correspondent en théorie et nous désignons leur somme par les lettres t ou T. Pour les raisons que nous avons indiquées en étudiant le rendement en acétone des polypeptides, il n'est pas possible de déterminer avec précision les quantités de leucine et de valine existant dans un mélange de polypeptides et d'acides aminés libres à un moment quelconque de l'hydrolyse. Nous pouvions peut-être avoir des renseignements sur la libération des groupements isopropyliques en calculant les taux respectifs de leucine et de valine et les quantités d'acétone qui devraient leur correspondre, si les formules permettant de calculer x et y dans notre méthode de dosage s'appliquaient aux hydrolysats. L'expérience nous a montré, en établissant trois courbes relatives aux quantités de leucine, de valine et d'acétone totale correspondantes, qu'on met ainsi parfois en évidence des accidents dans les courbes représentatives de la valeur de la leucine ou de la valine sans que soit modifiée celle de l'acétone totale. Les accidents ainsi observés prouvent que l'hydrolyse libère peut-être de la leucine et de la valine et à coup sûr des polypeptides plus ou moins complexes dans lesquels sont engagés ces mêmes acides aminés, et que, suivant la nature des liaisons (R-leucine ou leucyl-R) les groupements isopropyliques sont générateurs de quantités d'acétone plus ou moins grandes. Ceci modifie les valeurs du rapport a/b et, comme celles de a et de b interviennent dans le calcul de x et de y, il en résulte des accidents sur les courbes traduisant la libération de la leucine et de la valine. Par compensation, si le taux de l'un des acides aminés diminue, celui de l'autre augmente et l'acétone totale conserve la valeur qu'elle aurait si l'on se trouvait non plus en présence de polypeptides de leucine et de valine, mais d'un mélange des deux acides aminés.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XVI.

TABLEAU XVI. — *Acétone sous pression (a) et directe (b) pour 100 de protéine, acétone totale (t) correspondant à la leucine et à la valine pour 100 de protéine, et quantités d'acétone* (A, B, T) *pour 100 d'acétone obtenue en fin d'hydrolyse.*

Nature de la protéine et durée de l'hydrolyse	Acétone p. 100 de protéine			Acétone p. 100 d'acétone finale		
	a	*b*	*t* (calc.)	A	B	T (calc.)
I. — HYDROLYSE ACIDE.						
Globine de Lapin :						
0 heure	0,76	0,81	1,00	12,4	18,3	8,4
1 —	1,41	0,77	2,89	23,1	17,4	24,2
2 —	3,14	2,19	6,14	51,2	49,6	51,6
4 —	4,36	2,74	8,79	71,2	62,0	74,0
6 —	4,42	2,90	8,78	72,2	68,4	74,0
8 —	4,55	3,14	8,96	74,2	71,0	75,5
16 —	5,33	4,36	9,78	87,0	99,0	82,2
24 —	6,12	4,42	11,88	100,0	100,0	100,0
Edestine :						
1/2 heure	0,79	0,48	1,57	23,6	16,3	25,9
2 —	1,28	0,77	2,61	38,2	26,0	43,0
4 —	2,19	1,48	4,31	65,4	50,2	70,8
6 —	2,35	1,30	6,05	70,2	43,8	100,0
8 —	2,64	1,36	5,14	78,8	45,8	85,0
12 —	3,31	2,11	6,52	99,0	71,2	100,0
14 —	3,28	2,57	6,22	98,0	86,6	100,0
20 —	3,09	2,44	5,80	92,4	82,4	95,7
24 —	3,35	2,96	6,06	100,0	100,0	100,0
Caséine :						
0 heure	0,31	0,28	0,41	6,4	8,3	4,4
2 —	1,83	1,08	3,67	39,2	31,9	39,1
4 —	3,72	1,43	9,60	77,2	42,2	100,0
6 —	3,72	2,01	7,40	77,2	59,5	78,8
10 —	4,28	2,32	8,70	89,0	68,6	92,6
16 —	4,28	3,25	8,00	89,0	97,2	84,8
20 —	4,65	3,38	9,02	96,8	100,0	95,8
30 —	4,81	3,38	9,38	100,0	100,0	100,0
Zéine :						
0 heure	0,34	0,20	0,67	6,1	8,3	5,1
2 —	1,17	0,40	3,19	20,9	16,7	23,2
4 —	2,85	0,80	8,49	51,0	33,4	47,6
7 —	3,71	1,34	10,64	66,1	55,8	73,8
14 —	4,57	2,02	10,92	81,7	84,2	80,2
32 —	5,71	2,62	13,31	100,0	100,0	97,6
36 —	5,71	2,57	13,61	100,0	100,0	99,9
60 —	5,60	2,40	13,62	100,0	100,0	100,0

TABLEAU XVI (*suite*). — *Acétone sous pression (a) et directe (b) pour 100 de protéine, acétone totale (t) correspondant à la leucine et à la valine pour 100 de protéine, et quantités d'acétone (A, B, T) pour 100 d'acétone obtenue en fin d'hydrolyse.*

Nature de la protéine et durée de l'hydrolyse	Acétone p. 100 de protéine			Acétone p. 100 d'acétone finale		
	a	*b*	*t* (calc.)	A	B	T (calc.)
II. — Hydrolyse acide et précipitation phosphotungstique.						
Edestine :						
2 heures	1,13	0,61	2,57	37,5	23,1	46,9
8 —	1,81	1,30	3,43	60,1	49,6	62,8
16 —	2,31	1,94	4,26	76,7	73,4	77,9
24 —	2,30	1,97	4,21	76,4	74,6	76,9
30 —	3,01	2,64	5,47	100,0	100,0	100,0
III. — Hydrolyse alcaline.						
Caséine :						
1/4 heure	0,74	0,45	1,85	17,3	11,4	25,9
4 —	3,13	1,14	8,30	73,2	29,0	114,0
6 —	3,08	1,19	7,96	71,1	30,2	111,0
8 —	3,08	1,19	7,96	71,1	30,2	111,0
16 —	3,53	3,36	6,17	82,7	85,4	86,0
24 —	4,27	3,93	7,14	100,0	100,0	100,0
Zéine :						
1/2 heure	1,14	0,57	2,3	19,9	20.4	17.9
2 —	2,91	0,51	9,1	50,9	18,2	71,0
4 —	4,35	1,20	13,0	76,0	42,8	100,0
6 —	4,83	1,42	14,3	84,9	50,6	100,0
8 —	5,32	2,66	12,6	93,8	94,8	111,0
16 —	5,14	2,28	12,2	89,9	81,6	95,0
24 —	5,72	2,80	12,8	100,0	100,0	100,0

Les données figurant dans le tableau XVI nous ont permis de tracer les courbes représentées sur les figures 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10.

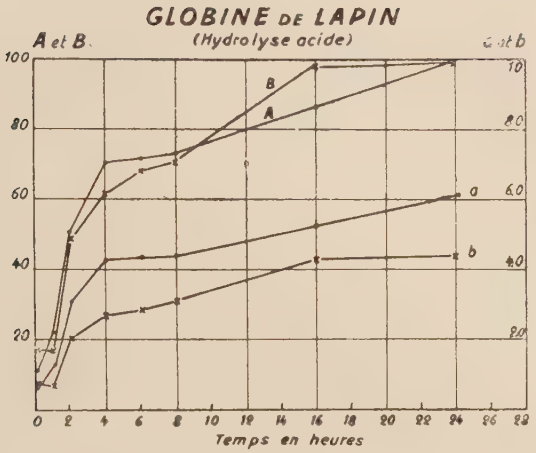


FIGURE 4. — *Acétone formée par oxydation chromique de la globine de Lapin à divers stades de l'hydrolyse* acide (SO_4H_2 6N).

Abscisses : Temps d'hydrolyse en heures.

Ordonnées : Mg. d'acétone formée à partir de 100 mg. de protéine (oxydation sous pression [*a*] et directe [*b*]) et en p. 100 de l'acétone obtenue à partir du produit de l'hydrolyse totale (oxydation sous pression [*A*] et directe [*B*]).

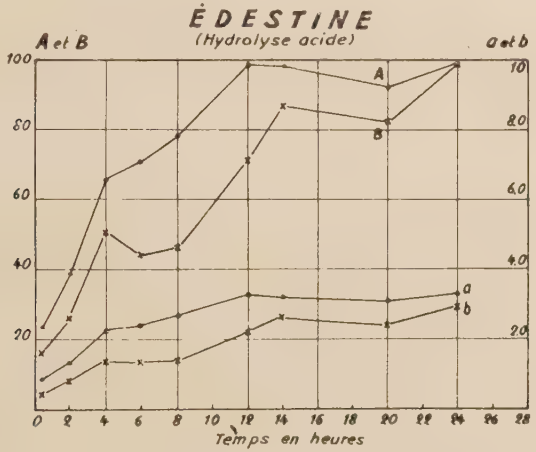


FIGURE 5. — *Acétone formée par oxydation chromique de l'édestine à divers stades de l'hydrolyse* acide (SO_4H_2 6N).

Abscisses : Temps d'hydrolyse en heures.

Ordonnées : Mg. d'acétone formée à partir de 100 mg. de protéine (oxydation sous pression [*a*] et directe [*b*]) et en p. 100 de l'acétone obtenue à partir du produit de l'hydrolyse totale (oxydation sous pression [*A*] et directe [*B*]).

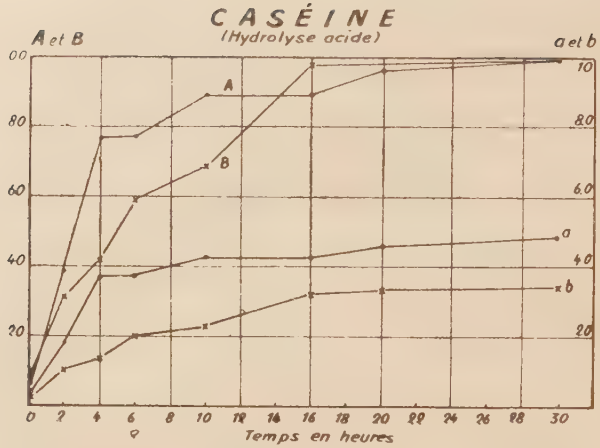


FIGURE 6. — *Acétone formée par oxydation chromique de la caséine à divers stades de l'hydrolyse* acide (SO_4H_2 6N).

Abscisses : Temps d'hydrolyse en heures.

Ordonnées : Mg. d'acétone formée à partir de 100 mg. de protéine (oxydation sous pression [*a*] et directe [*b*]) et en p. 100 de l'acétone obtenue à partir du produit de l'hydrolyse totale (oxydation sous pression [*A*] et directe [*B*]).

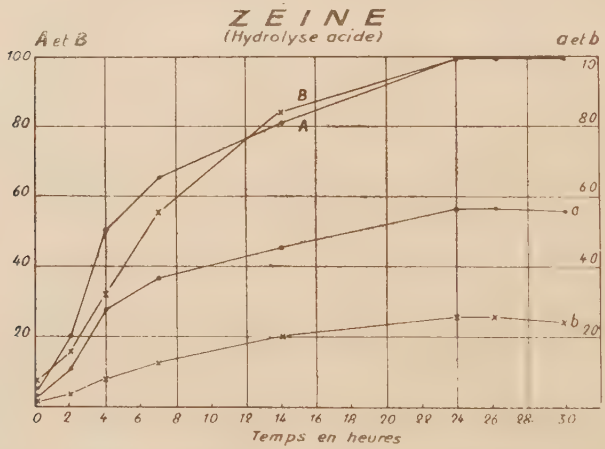


FIGURE 7. — *Acétone formée par oxydation chromique de la zéine à divers stades de l'hydrolyse* acide (SO_4H_2 6N).

Abscisses : Temps d'hydrolyse en heures.

Ordonnées : Mg. d'acétone formée à partir de 100 mg. de protéine (oxydation sous pression [*a*] et directe [*b*]) et en p. 100 de l'acétone obtenue à partir du produit de l'hydrolyse totale (oxydation sous pression [*A*] et directe [*B*]).

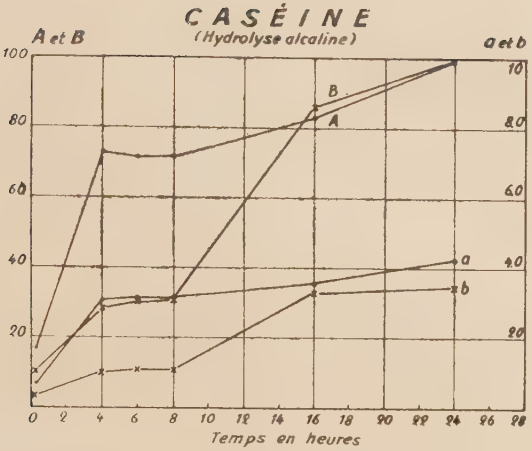


FIGURE 8. — *Acétone formée par oxydation chromique de la caséine à divers stades de l'hydrolyse* alcaline (NaOH 6N).

Abscisses : Temps d'hydrolyse en heures.

Ordonnées : Mg. d'acétone formée à partir de 100 mg. de protéine (oxydation sous pression [*a*] et directe [*b*]) et en p. 100 de l'acétone obtenue à partir du produit de l'hydrolyse totale (oxydation sous pression [*A* et directe [*B*]).

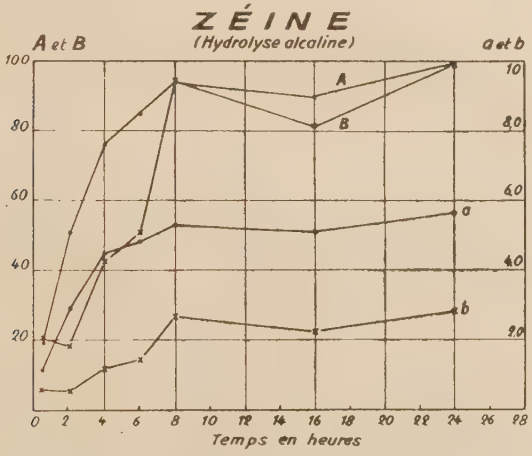


FIGURE 9. — *Acétone formée par oxydation chromique de la zéine à divers stades de l'hydrolyse* alcaline (NaOH 6N).

Abscisses : Temps d'hydrolyse en heures.

Ordonnées : Mg. d'acétone formée à partir de 100 mg. de protéine (oxydation sous pression [*a*] et directe [*b*]) et en p. 100 de l'acétone obtenue à partir du produit de l'hydrolyse totale (oxydation sous pression [*A*] et directe [*B*]).

FIGURE 10. — *Acétone formée par oxydation chromique de l'édestine et des produits de son hydrolyse non précipitables par l'acide phosphotungstique à divers stades de l'hydrolyse* acide (SO_4H_2 6N).

Abscisses : Temps d'hydrolyse en heures.

Ordonnées : Mg. d'acétone formée à partir de 100 mg. de protéine (oxydation sous pression [*a*] et directe [*b*]).

Hydrolysat total, *a* : ●—●, b x——x, fraction non précipitée par l'acide phosphotungstique, *a* : o——o, *b* □——□).

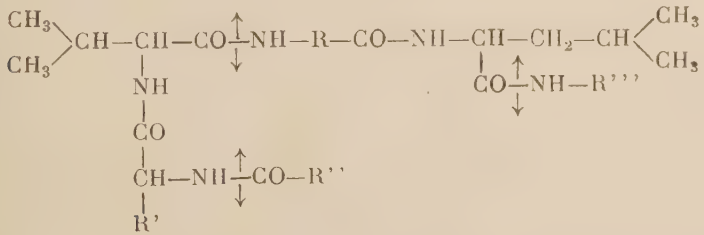
Examen d'ensemble des résultats.

Un certain nombre de faits se dégagent de l'examen des résultats obtenus. Ils portent sur les valeurs initiales, sur la libération de la leucine et de la valine, sur la mise en évidence d'une fraction de ces acides aminés facilement libérable et enfin sur la différence de structure des protéines de divers types.

I. — HYDROLYSE ACIDE.

Cas de la globine de Lapin. — Il n'est pas possible de donner une interprétation assez précise des résultats obtenus sur cette protéine (fig. 4), étant donnée la coexistence probable, dès les premières heures de l'hydrolyse, de leucine, de valine et de polypeptides appartenant aux deux types qui nous intéressent. Toutefois, en essayant de suivre l'évolution du phénomène hydrolytique nous sommes amenés à faire diverses constatations.

Au temps zéro, la valeur du rapport a/b inférieure à 1 et le rendement minime en acétone nous obligent à considérer la leucine et la valine comme engagées dans des polypeptides du type R-leucine ou -valine ; les groupements $-NH_2$ voisins des groupements isopropyliques sont donc alors bloqués dans des liaisons peptidiques. L'action de l'hydrolyse se poursuivant, des groupements $-NH_2$ sont libérés et on assiste, en quatre heures, à une ascension brusque du rendement en acétone ; ce fait peut traduire la libération, à côté de leucine et de valine, de polypeptides dans lesquels la majorité des groupements isopropyliques sont sous la forme leucyl- ou valyl-R. Nous constatons, en quatre heures, la libération de 72 p. 100 d'acétone (A p. 100) tandis qu'il faut encore vingt heures d'hydrolyse pour atteindre 100 p. 100. Dès la quatrième heure, les points correspondants aux temps 4, 6 et 8 heures, pour a p. 100, ont sensiblement la même valeur, tandis que celles du rapport a/b diminuent. L'interprétation la plus plausible de ce fait est que l'hydrolyse acide libère pendant ce temps surtout des polypeptides du type R.-leucine ou -valine. En effet, il n'y a probablement pas alors une libération importante de valine où de leucine, car les points des courbes correspondant à ces temps n'auraient pas conservé sensiblement la même valeur pour a p. 100. De plus, la valeur du raport a/b diminue très légèrement, ce qui ne peut traduire qu'un enrichissement en polypeptides du type cité. L'hydrolyse, de la quatrième à la huitième heure, ne paraît donc pas rompre des liaisons peptidiques intéressant le $-NH_2$ de la valine ou de la leucine, mais des liaisons —CO—NH— reliant des polypeptides de poids moléculaire plus faible, dans lesquels le groupement aminé de la leucine ou de la valine reste bloqué. C'est ce qu'essaye d'expliquer le schéma suivant :



L'hydrolyse, assez lente de la huitième à la seizième heure, correspond à l'apparition plus marquée soit de polypeptides du type R-leucine, soit de valine libre, puisque la valeur du

rapport a/b diminue. Enfin, de la seizième à la vingt-quatrième heure, on assiste à la mise en liberté de polypeptides du type leucyl- ou valyl-R en même temps que l'hydrolyse de ces peptides aboutit à la mise en liberté complète de la leucine et de la valine, avec prédominance de la première puisque la valeur du rapport a/b augmente, les taux finaux de leucine et de valine étant respectivement de 19,7 et 6,4 p. 100.

En somme, pendant les quatre premières heures, on assiste à l'enrichissement du milieu d'hydrolyse en polypeptides du type valyl- ou leucyl-R ou en leucine, qu'on retrouve de la seizième à la vingt-quatrième heure, tandis que, de la quatrième à la seizième, on constate une augmentation marquée du taux des polypeptides du type R-leucine ou -valine ou en valine libre. La fraction de la leucine facilement libérée paraît engagée dans des liaisons peptidiques à l'extrémité de chaînes, tandis que la valine occuperait une position plus interne dans ces chaînes.

Cas de l'édestine. — Les courbes représentées par la figure 5 montrent une libération d'acétone moins rapide au début de l'hydrolyse que dans le cas de la globine. Après une demi-heure d'hydrolyse on peut dire qu'il existe en bout de chaîne de la leucine ou de la valine engagées en partie dans des peptides du type leucyl- ou valyl-R (valeur du rapport $a/b = 1,6$) et que, l'action de l'acide se poursuivant, on observe pendant les quatre premières heures l'hydrolyse de liaisons peptidiques sans modification sensible de la valeur du rapport a/b, ce qui traduit une première différence entre les structures de la globine et de l'édestine. Entre la quatrième et la huitième heure, on assiste à la libération rapide et dominante de polypeptides du type leucyl- ou valyl-R et, sans doute aussi, de leucine. De la huitième à la quatorzième heure, et surtout de la douzième à la quatorzième, on note un brusque abaissement de la valeur du rapport a/b, montrant une tendance à la libération soit de polypeptides du type R-valine ou -leucine soit de valine puisque, à partir de la douzième heure, la quantité d'acétone correspondant à l'oxydation directe (b), subit une rapide élévation. Enfin, de la vingtième à la vingt-quatrième heure, l'hydrolyse termine son action par la libération de la leucine et surtout de la valine encore engagées dans des polypeptides simples. La tendance à la mise en liberté de corps du type leucyl- ou valyl-R ou de leucine est nette pendant les huit premières heures de l'hydrolyse. Ensuite, on constate la

tendance à la mise en liberté de polypeptides du type R-leucine ou -valine et de valine.

En somme, la comparaison entre les courbes de la globine et celles de l'édestine fait nettement ressortir la différence existant dans la mise en liberté de polypeptides des divers types, aux divers temps de l'hydrolyse, ce qui témoigne d'une diversité de structure de ces deux protéines.

Cas de la caséine. — Les courbes relatives à l'hydrolyse de cette protéine (fig. 6) présentent beaucoup d'analogies avec celles de la globine et l'interprétation que nous en donnons est voisine.

Au temps zéro, la leucine et la valine sont engagées dans des polypeptides du type R-leucine (a/b = 1,10). Pendant les quatre premières heures, la libération d'acétone est plus rapide que dans les cas de la globine et de l'édestine puisqu'elle est déjà, pour A p. 100 de 77,2 p. 100 contre 71,2 p. 100 et 65,4 p. 100. Le milieu d'hydrolyse s'enrichit rapidement en polypeptides du type leucyl-R ou en leucine, surtout entre la seconde et la quatrième heure (a/b = 2,6). Vers la seizième heure, il y a libération de polypeptides du type R-leucine ou -valine, ou de valine et, de la seizième à la trentième heure, une nouvelle libération de polypeptides du type leucyl- ou valyl-R ou de leucine. Les teneurs en leucine et en valine sont respectivement de 16,2 p. 100 et 4,5 p. 100 dans cette protéine.

Cas de la zéine. — Cette protéine renferme 30 p. 100 de leucine pour 2,2 p. 100 de valine. Son étude, particulièrement intéressante, nous montre l'augmentation rapide du rapport a/b, la libération progressive de polypeptides du type leucyl- ou valyl-R, et de leucine. En effet, la valeur de ce rapport, très élevée (3,5) à la quatrième heure traduit la présence de tels peptides. Le peu de valine contenue dans cette protéine paraît être mis en liberté entre la septième et la quatorzième heure. Sur les quatre protéines étudiées c'est la zéine qui se révèle la plus résistante à l'action de l'hydrolyse acide puisqu'à la quatrième heure la quantité d'acétone, A p. 100, ne représente que 50 p. 100 de l'acétone finale.

II. — Hydrolyse acide et précipitation phosphotungstique.

Etant données les difficultées rencontrées pour interpréter les courbes précédentes du fait de la présence simultanée de

leucine, de valine et de polypeptides de ces deux acides aminés nous avons essayé de suivre la libération de ces derniers et de leurs polypeptides simples en soumettant l'hydrolysat à l'action du réactif phosphotungstique. Cependant, au cours de diverses recherches [111] dont certaines sur le dosage de la leucine, de la valine d'une part, de l'alanine et de la somme : sérine + acide aspartique d'autre part, l'expérience nous a prouvé que la présence de ce réactif empêchait l'oxydation chromique du groupement isopropylique ; aussi avons-nous eu soin d'éliminer l'excès de réactif suivant la technique de Plimmer [126]. Nous espérions ainsi suivre de plus près l'hydrolyse afin d'en dégager des conclusions précises.

Cas de l'édestine. — L'hydrolyse acide de l'édestine doit libérer rapidement des polypeptides de leucine et de valine de poids moléculaire assez faible puisqu'après défécation phosphotungstique on trouve encore des taux d'acétone élevés ; c'est ainsi qu'à la deuxième heure le taux d'acétone sous pression, pour cent de protéine, est de 1,28 contre 1,13 après action du réactif phosphotungstique. L'hydrolyse n'est pas tout à fait complète en vingt-quatre heures, aussi ne faut-il pas tirer des conclusions trop hâtives pour interpréter ces données. Toutefois, on notera dans l'ensemble, un parallélisme très étroit entre les courbes donnant *a* p. 100 et *b* p. 100 après défécation phosphotungstique ; la valeur du rapport *a/b* étant de 1,30 après huit heures d'hydrolyse, de 1,20 après seize heures et de 1,16 après vingt quatre heures, il passerait donc en solution, à mesure de leur libération, des polypeptides du type R-leucine ou -valine ; cependant, la valeur de ce rapport étant de 1,8 au temps deux heures, il semble bien que l'hydrolyse acide commence par détacher de la leucine libre (valeur théorique : 1,8).

III. — Hydrolyse alcaline.

Cas de la caséine. — On voit que, dans l'ensemble, l'aspect de ces courbes (fig. 8) ne rappelle pas celui des courbes obtenues par hydrolyse acide ; nous devons constater qu'on observe des différences marquées portant sur les points suivants :

La libération de polypeptides du type leucyl- ou valyl-R est beaucoup plus importante au début de l'hydrolyse alcaline. En effet, les valeurs du rapport *a/b* sont ici plus élevées pour

les temps correspondants à 2, 4, 6 et 8 heures. L'apparition de polypeptides du type R-leucine ou -valine est plus nette entre la huitième et la seizième heure ; pour ce dernier point, la valeur du rapport a/b est égale à 1,0. L'hydrolyse est toutefois moins complète à la vingt quatrième heure par action des bases que par celle des acides. Elle libère plus que celle de l'acide sulfurique les $-NH_2$ de la leucine ou de la valine comprises dans les polypeptides du type leucyl- ou valyl-R, ce qui permet l'oxydation sous pression avec un rendement en acétone plus élevé des groupements isopropyliques.

En somme, la soude agit d'une manière bien différente de celle de l'acide sulfurique sur la molécule protéique pour en libérer la leucine et la valine, ce qui témoigne de la résistance plus ou moins grande de certaines liaisons peptidiques (ou autres) aux divers agents d'hydrolyse.

Cas de la zéine. — Ici encore, nous notons l'action différente de l'hydrolyse alcaline (fig. 49) ; beaucoup plus énergique que l'hydrolyse acide, elle permet une libération d'acétone plus grande, qu'on peut considérer comme complète à la huitième heure. La valeur du rapport a/b, très élevée après deux heures d'hydrolyse (5,7) décroît jusqu'à la huitième heure (3,6 pour 4 heures, 3,4 pour 6 heures et 2,0 pour 8 heures) ; on doit vraisemblablement en conclure que les polypeptides du type leucyl- ou valyl-R ont leur $-NH_2$, voisin du groupement isopropylique, immédiatement libéré.

La zéine contenant peu de valine (2,2 p. 100) nous pensons que celle-ci, ou tout au moins les polypeptides du type R-valine apparaissent dans le milieu d'hydrolyse surtout entre les sixième et huitième heures. Comme les dosages de la leucine et de la valine après vingt-quatre heures d'hydrolyse alcaline fournissent les mêmes taux qu'après trente heures d'hydrolyse acide, nous devons admettre que celle-ci est moins rapide dans son action. Après la huitième heure, l'hydrolyse alcaline ne doit porter que sur des polypeptides très simples, dont les groupements isopropyliques sont voisins de groupements aminés libres, étant donné que les valeurs de a p. 100 et de b p. 100 d'une part n'augmentent plus guère et que, d'autre part, les courbes représentatives de ces valeurs sont sensiblement parallèles.

La comparaison des courbes relatives à la libération de l'acétone dans les cas de la caséine et de la zéine met en évidence les différences de structure de ces deux protéines.

Discussion générale des résultats.

L'examen d'ensemble des résultats précédents nous a conduit à essayer d'interpréter certains d'entre eux et à en discuter le sens. Toutefois, il nous paraît utile de pousser un peu plus loin cette discussion, nous attachant plus particulièrement aux points suivants : 1° Evolution générale de l'hydrolyse acide ou alcaline et de la mise en liberté de la leucine et de la valine. 2° Diversité de l'hydrolyse acide ou alcaline. 3. Libération de la leucine et de la valine au cours de l'hydrolyse et constitution des protéines.

I. — Evolution générale de l'hydrolyse acide ou alcaline et mise en liberté de la leucine et de la valine.

En comparant entre elles les diverses courbes obtenues, on est immédiatement frappé par une certaine similitude dans les résultats de l'hydrolyse acide ou de l'hydrolyse alcaline.

On constate dans tous les cas l'oxydation rapide de groupements isopropyliques, puisqu'après quatre heures d'hydrolyse acide on obtient respectivement des rendements en acétone de 71,2 p. 100 de l'acétone totale libérée en fin d'hydrolyse (globine de Lapin), 50,2 p. 100 (édestine), 77,2 p. 100 (caséine), 51,0 p. 100 (zéine), et après la même durée d'hydrolyse alcaline de 73,2 p. 100 (caséine) et 76,0 p. 100 (zéine). C'est dire que les 2/3 des groupements isopropyliques contenus dans les protéines sont alors capables d'être oxydés par l'acide chromique pour fournir de l'acétone. Ceci implique comme condition la libération rapide des groupements aminés appartenant à la leucine ou à la valine de manière à ce qu'apparaissent des peptides du type leucyl- ou valyl-R et de la leucine ou de la valine libres. Exception faite pour la zéine, les trois autres protéines étudiées présentent un palier entre les quatrième et sixième ou huitième heures d'hydrolyse soit acide soit alcaline. Il est certain qu'à partir de la quatrième heure les agents d'hydrolyse continuent à exercer leur action, mais sur des polypeptides dans lesquels la leucine et la valine sont encore profondément engagées. En effet, les études de Vickery [167] sur l'hydrolyse acide ou alcaline de la gliadine montrent que ce processus est très régulièrement progressif. Cet auteur dose l'azote aminé (van Slyke) libéré en fonction du temps d'hydrolyse alcaline ou acide ; il constate l'action plus énergique de la première à normalité équivalente en réactif, les valeurs finales n'étant

pas modifiées. Après la sixième ou la huitième heure, l'hydrolyse continue à libérer des groupements isopropyliques, comme en témoignent les diverses courbes, cependant le phénomène est alors à la fois très ralenti et très progressif.

L'aspect des courbes d'hydrolyse et leur interprétation permettent de penser que la majeure partie de la leucine est rapidement libérée pendant les premières heures, la valine l'étant plus tardivement.

II. — Diversité des hydrolyses acide et alcaline.

Si l'hydrolyse acide et l'hydrolyse alcaline présentent un aspect général commun touchant l'évolution de la formation d'acétone à partir de leurs produits, elles diffèrent en plusieurs points, qui sont les suivants :

L'attaque des protéines ou des polypeptides de poids moléculaire encore élevé n'est pas la même suivant l'agent d'hydrolyse. C'est ce dont témoigne la valeur du rapport a/b, beaucoup plus élevée durant les huit premières heures de l'hydrolyse alcaline.

Sur une même protéine (caséine, par exemple) la libération d'acétone est plus ou moins rapide suivant qu'on a recours à l'un ou l'autre agent. Plus marquée pour l'hydrolyse acide dans le cas de la caséine (77,2 p. 100 contre 73,2 p. 100 après 4 heures d'action), elle l'est beaucoup moins dans le cas de la zéine (51,0 p. 100 contre 76,0 p. 100, pendant le même temps).

Toutefois, si des différences d'action séparent ces deux modes d'hydrolyse, les valeurs finales sont sensiblement identitiques, ce qui témoigne du fait que la leucine et la valine sont également stables dans les milieux acides ou alcalins.

III. — Libération de la leucine et de la valine au cours de l'hydrolyse et constitution des protéines.

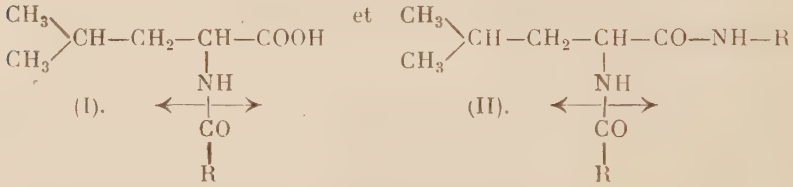
L'hydrolyse acide et alcaline de protéines diverses (globine, caséine, édestine et zéine) ne conduit pas aux mêmes résultats, ce qui traduit la diversité de structure des protéines étudiées. L'étude de chaque cas particulier nous a déjà montré la probabilité de l'exactitude d'un tel point de vue. Au cours de l'hydrolyse de diverses protéines, les résultats obtenus après un même temps sont parfois nettement différents. En particulier, les variations de la valeur du rapport a/b, sur lesquelles nous avons basé nos interprétations, ont montré

une libération généralement précoce et toujours dominante de leucine, la valine paraissant plus solidement fixée dans la molécule protéique.

Au temps zéro, la valeur de ce rapport est sensiblement égale à 1,0 (0,9 pour la globine de Lapin et 1,1 pour la caséine) et les quantités d'acétone obtenues sont très faibles ; il en découle que la leucine et la valine sont comprises dans des peptides du type R-leucine ou -valine. Nous assistons, généralement en quatre ou six heures, à une ascension rapide du rendement en acétone en même temps que la valeur du rapport *a/b* augmente, ce qui laisse supposer que la libération des groupements isopropyliques a lieu sous la forme leucyl- ou valyl-R. Il est, de plus, très probable que ces polypeptides sont alors accompagnés de leucine ou de valine libres.

En effet, la formation d'acétone par oxydation correspond à une fraction très élevée par rapport à celle obtenue en fin d'hydrolyse, ce qui va nécessairement de pair avec la présence de leucine et de valine libres, puisque le rendement en acétone des dipeptides ne semble jamais dépasesr 50 p. 100.

Au début de l'hydrolyse, ont doit envisager le dédoublement de liaisons des types :



libérant, les uns (I) de la leucine ou de la valine, les autres (II) des leucyl- ou valyl-peptides, seuls oxydables avec des rendements en acétone assez importants dans les conditions où nous nous sommes placés.

Il ressort de cette discussion que les différences observées à la suite de l'hydrolyse acide ou alcaline de protéines diverses doivent être attribuées à la structure même de chacune de ces protéines. La libération très rapide de quantités d'acétone importantes, mais variables d'une protéine à l'autre (après 4 heures d'hydrolyse acide, A p. 100 = 71,2 pour la globine, 65,4 pour l'édestine, 77,2 pour la caséine et 51,0 pour la zéine) d'une part, les variations du rapport *a/b* au cours de l'hydrolyse d'autre part, ainsi que la mise en liberté précoce de la leucine montrent que les molécules protéiques ne doivent pas être considérées comme présentant la structure homogène qu'implique la conception de Bergmann et Niemann [33]. Cer-

tains acides aminés ou polypeptides sont en effet très facilement libérables en quantité importante, tandis que d'autres sont compris dans des polypeptides plus résistants aux agents chimiques qui constitueraient en quelque sorte le squelette de la molécule protéique. La leucine apparaît comme faisant surtout partie de la fraction périphérique, la valine étant un des nombreux acides aminés participant plus particulièrement à la structure interne de l'édifice moléculaire.

C. — Hydrolyse enzymatique des protéines.

Le mode d'action de la pancréatine, de la pepsine et de la papaïne sur les protéines a fait l'objet d'un grand nombre de recherches, montrant que les deux derniers de ces enzymes hydrolysent spécifiquement des liaisons peptidiques particulières, sans qu'il soit encore possible de définir avec précision la position de celles-ci dans la molécule protéique. L'étude de la mise en liberté des acides aminés au cours de l'hydrolyse enzymatique étant susceptible d'apporter des renseignements sur leur position en bout des chaînes polypeptidiques ou en dehors de l'extrémité de celles-ci, a depuis longtemps retenu l'attention.

Nous avons eu l'occasion de citer les travaux d'Emmerling [52], de Kutscher et Lohmann [91], de Bergmann et Niemann [33], relatifs à l'action de la papaïne sur diverses protéines. Les derniers auteurs ont récemment établi que la papaïne agissant sur la fibrine donne naissance non seulement à de la leucine mais aussi à de l'isoleucine, de la phénylalanine, du tryptophane et de la tyrosine ; Michel [105] a confirmé ces résultats en ce qui concerne la phénylalanine. Ceci laisse supposer que la papaïne agit à la fois sur les liaisons « endomoléculaires » et sur les liaisons en bout de chaîne. Cette action est encore plus marquée pour la pancréatine qui apporte un mélange d'enzymes protéolytiques : des protéinases et des polypeptidases, ces dernières détachant successivement des acides aminés à l'extrémité des chaînes peptidiques libérées par les premières. Aussi l'hydrolyse des liaisons peptidiques est-elle alors à la fois rapide et profonde. Tel n'est pas le cas pour la pepsine que certains auteurs (Abderhalden [6], Jones et Gersdorff [72]) considèrent comme incapable de libérer des acides aminés, bien que de la tyrosine (Northrop [115], Calvery et Schock [43]), de la lysine (Felix

[57]) et de l'arginine (Lieben et Lieber [100]) aient été isolées en petites quantités, à partir des produits résultant de son action sur des histones, sur l'ovalbumine.

Dès lors, ces protéinases ne sauraient être considérées comme agissant d'une manière identique sur une même protéine puisque la pancréatine, la papaïne et la pepsine donnent respectivement naissance à des acides aminés, à un mélange d'acides aminés et de peptides de poids moléculaire assez faible, et à un mélange d'acides aminés et de peptides de poids moléculaire assez élevé (peptones) dans lequel ces derniers dominent. L'hydrolyse des liaisons peptidiques est-elle conditionnée non seulement par leur position, mais aussi par la nature des acides aminés qui y participent ?

Il nous a paru utile d'apporter une contribution à ces recherches en reprenant l'étude de la libération de la leucine et de la valine pendant l'action de ces trois enzymes sur des protéines. Cette étude nous laissait entrevoir la possibilité de préciser le mode d'action de la papaïne et de la pepsine tout en nous renseignant utilement sur les positions respectives de la leucine et de la valine dans les protéines. Quant à l'action de la pancréatine, conduisant à l'hydrolyse totale si l'on a soin d'éliminer continuellement les produits de son action, ses premiers stades sont-ils comparables à ceux de l'hydrolyse acide ou alcaline ?

Notre but peut être défini de la manière suivante : Etudier comparativement la libération de la leucine et de la valine par action de la pancréatine, de la papaïne et de la pepsine, afin de déterminer : 1) si la position de ces deux acides aminés dans les molécules protéiques est identique ; 2) si ces enzymes hydrolysent en totalité ou en partie les liaisons peptidiques dans lesquelles sont engagées la leucine et la valine ; 3) si l'action des protéinases est équivalente sur les diverses protéines, ceci afin de chercher à mettre en évidence les différences de structure caractérisant chaque type de protéine.

Matériel d'étude et technique.

Le matériel de recherche est constitué par des protéines (globines de Lapin, de Bœuf, de Cheval, édestine et caséine) qui nous ont déjà servi à étudier la libération de la leucine et de la valine au cours de l'hydrolyse acide ou alcaline.

Schéma général des expériences. - On dissout un poids connu de protéine dans un certain volume d'eau en utilisant

un minimum d'acide (chlorhydrique ou acétique) ou de soude dilués si cela est nécessaire, on ajuste le pH de manière à ce qu'il soit voisin de l'optimum d'action de l'enzyme mis en œuvre (9,1 à 9,2 dans le cas de la pancréatine ; 5,0 à 5,5 ou 7,8 dans celui de la papaïne ; aux environs de 2,0 quand il s'agit de la pepsine). Un tampon (mélange de Sörensen : borate de sodium + soude, pour la pancréatine, acétate de sodium + acide acétique pour la papaïne) est ajouté au milieu. Nous avons évité l'usage des tampons au citrate (Rona [142]), ce dernier sel faussant les résultats du dosage d'acétone. On met généralement en contact une quantité d'enzyme égale, en poids, au dixième de celui de la protéine. Ceci fait, on complète à un volume connu. Pour éviter toute action microbienne on a soin de recouvrir le liquide de digestion avec quelques centimètres cubes de toluène ; une agitation répétée chaque jour permet à celui-ci de saturer le milieu d'hydrolyse et empêche la contamination par les bactéries. Dans le cas de la digestion papaïnique, la présence de cyanure est suffisante à elle seule pour s'opposer à toute multiplication de germes.

L'hydrolyse de la protéine est suivie par le dosage de l'azote aminé (van Slyke) et l'apparition des groupements isopropyliques générateurs d'acétone par oxydation chromique.

Les enzymes utilisés proviennent de la maison Byla et leur titre officinal en activité protéolytique a été vérifié.

Fractionnement par l'acide phosphotungstique des produits de l'hydrolyse. — Après un temps de contact de plusieurs mois on obtient un rendement en acétone appréciable, ce qui est la preuve manifeste du clivage de liaisons peptidiques auxquelles participent des molécules de leucine ou de valine. Les taux en acétone étant assez élevés (40,3 p. 100 dans le cas de la papaïne et 22,5 p. 100 dans celui de la pepsine), nous avons fractionné les milieux de digestion enzymatique au moyen du réactif phosphotungstique et étudié comparativement l'hydrolysat initial et le filtrat résultant de l'action du réactif avant et après hydrolyse sulfurique des peptides qu'il peut contenir. La précipitation phosphotungstique permet d'éliminer les peptones et les polypeptides de poids moléculaire élevé et, par là même, de séparer d'eux la leucine et la valine, libres ou comprises dans des polypeptides de faible poids moléculaire. Aussi pensions-nous que l'augmentation éventuelle du rendement en acétone après hydrolyse de la

fraction non précipitée par l'acide phosphotungstique traduirait grossièrement les proportions relatives de leucine et de valine libres ou combinées dans des peptides de chaîne assez courte présents dans cette fraction.

Le mode opératoire adopté est le suivant :

On verse goutte à goutte du réactif phosphotungstique (acide phosphotungstique 20 gr., acide sulfurique à 5 p . 100 q.s.p. 100 cm^3) dans 50 cm^3 d'hydrolysat papaïnique (ou pepsique) jusqu'à cessation de toute précipitation. Après séjour de 6 heures à la glacière on centrifuge et lave deux fois le culot de centrifugation avec 5 cm^3 d'une dilution au quart du réactif.

Le culot est traité par 10 cm^3 d'eau acidulée par SO_4H_2 et l'acide phosphotungstique éliminé par trois extractions successives à l'éther. Le résidu est solubilisé dans de la soude diluée, on porte à 50 cm^3 et l'on dose l'azote total, l'acétone formée après oxydation chromique sous pression et directe, afin de préciser l'importance du produit précipité et s'il possède ou non des groupements isopropyliques oxydables, voisins de NH_2 libres.

Le liquide renfermant les phosphotungstatse solubles est traité suivant la méthode de Plimmer [**126**] pour éliminer l'acide phosphotungstique, lequel gêne l'oxydation de la leucine et de la valine. On centrifuge, on lave le précipité et on porte à un volume de 150 cm^3. On dose l'acétone formée par oxydation chromique sous pression et directe, d'une part sur une prise d'essai, et, d'autre part, sur le produit de l'hydrolyse d'une autre prise d'essai par SO_4H_2 6 N, cette dernière opération libérant la leucine et la valine engagées dans des polypeptides.

Résultats expérimentaux.

A. — Hydrolyse pancréatique, papaïnique et pepsique de diverses protéines.

Nous faisons figurer dans ces résultats la durée de l'hydrolyse, le pH aux divers temps, les quantités d'azote aminé, d'acétone sous pression (*a*) et d'acétone directe (*b*), en mg. pour 100 mg. de protéine. La valeur du rapport a/b nous ayant fourni de précieux renseignements au cours de l'hydrolyse acide ou alcaline des protéines, nous avons calculé cette valeur aux divers temps de l'hydrolyse enzymatique.

TABLEAU XVII. - *Hydrolyse de diverses protéines par la pancréatine, à 37°.*

Résultats exprimés en mg. pour 100 mg. de protéine (*a* et *b*), et en p. 100 d'acétone obtenue après hydrolyse acide totale (A et B).

Nature de la protéine et temps de l'expérience	pH	N (VAN SLYKE)	Acétone formée par oxydation chromique				Rapport $\frac{a}{b}$
			sous pression		directe		
			a	A	*b*	B	
A. — Globine de Lapin :							
0	9,2	2,70	0,76	12,4	0,81	18,3	0,93
20 minutes	9,2	3,73	—	—	—	—	—
22 heures	9,2	8,97	3,01	49,1	2,31	52,2	1,30
48 —	9,2	8,97	2,72	44,4	1,97	44,5	1,38
72 —	9,2	11,25	2,72	44,4	2,12	47,7	1,28
96 —	9,2	10,47	2,87	46,8	2,21	50,0	1,29
B. — Globine de Bœuf :							
0	9,2	3,17	0,72	12,6	0,77	17,9	0,93
20 minutes	9,2	6,37	—	—	—	—	—
20 heures	9,2	12,75	4,63	81,7	2,44	57,0	1,89
40 —	9,2	11,25	4,63	81,7	2,98	69,6	1,55
60 —	9,2	12,12	4,81	84,7	2,88	67,2	1,67
80 —	9,1	12,10	4,72	83,2	3,10	72,1	1,52
C. — Globine de Cheval :							
0	9,2	2,30	0,61	8,7	0,82	15,0	0,74
20 minutes	9,2	4,56	—	—	—	—	—
20 heures	9,2	8,51	5,23	75,1	3,00	55,0	1,59
40 —	9,2	9,06	5,45	78,8	2,90	53,3	1,87
60 —	9,2	9,06	5,39	77,4	3,04	55,8	1,77
80 —	9,1	8,90	5,48	78,9	2,93	53,8	1,87
D. — Edestine :							
0	9,2	2,62	0,15	4,4	0,17	5,7	0,88
20 minutes	9,2	6,25	—	—	—	—	—
20 heures	9,2	10,50	1,92	57,3	1,55	52,7	1,24
40 —	9,1	11,25	2,22	66,2	1,92	64,5	1,15
60 —	9,1	10,62	2,16	64,4	2,00	67,5	1,08
80 —	9,1	10,64	2,22	66,2	2,00	67,5	1,11
E. — Caséine :							
0	9,2	1,84	0,18	3,7	0,14	4,1	1,28
20 minutes	9,2	2,37	—	—	—	—	—
20 heures	9,1	6,12	2,06	42,8	1,33	39,3	1,54
40 —	9,0	7,50	2,32	48,2	1,39	41,1	1,67
60 —	9,0	7,77	2,31	48,0	1,39	41,1	1,67
80 —	9,0	7,50	2,32	48,2	1,33	39,3	1,75

TABLEAU XVIII. — *Hydrolyse de diverses protéines par la papaïne, à 37°.*

Résultats exprimés en mg. pour 100 mg. de protéine (*a* et *b*), et en p. 100 d'acétone obtenue après hydrolyse acide totale (A et B).

Nature de la protéine et temps de l'hydrolyse	pH	N (van Slyke)	Acétone formée par oxydation chromique				Rapport $\frac{a}{b}$
			sous pression		directe		
			a	A	*b*	B	
A. — Globine de Bœuf :							
0	5,5	2,25	—	—	—	—	—
14 heures	5,5	5,10	0,28	4,9	0,22	5,1	1,27
74 —	5,5	5,18	0,44	7,7	0,24	5,6	1,83
160 —	5,5	6,12	0,75	13,2	0,44	10,2	1,70
B. — Globine de Cheval :							
0	5,4	2,81	0,63	9,0	0,59	10,8	1,07
14 heures	5,4	—	0,81	11,6	0,70	12,8	1,15
62 —	5,4	6,93	0,77	11,0	0,68	12,5	1,13
206 —	5,4	7,81	1,02	14,6	0,65	11,9	1,56
246 —	5,4	7,40	0,91	13,0	0,57	10,4	1,59
C. — Edestine :							
0	5,0	0,31	0,15	4,5	0,17	5,7	0,88
16 heures	4,9	—	0,23	6,8	0,16	5,4	1,43
70 —	4,9	5,32	0,40	11,9	0,40	13,5	1,00
160 —	4,9	—	0,37	11,0	0,32	10,8	1,15
320 —	4,9	5,32	0,45	13,4	0,40	13,5	1,12
D. — Caséine :							
0	7,7	1,09	0,19	3,9	0,13	3,8	1,46
24 —	7,6	2,51	0,30	6,2	0,26	7,7	1,14
36 —	7,6	—	0,34	7,0	0,28	8,2	1,21
140 —	7,6	3,11	0,40	8,3	0,26	7,7	1,54
300 —	7,6	3,18	0,34	7,0	0,28	8,2	1,21
178 jours	7,5	5,94	1,94	40,3	1,33	39,3	1,45

TABLEAU XIX. — *Hydrolyse de diverses protéines par la pepsine, à 37°.*

Résultats exprimés en mg. pour 100 mg. de protéine (*a* et *b*), et en p. 100 d'acétone obtenue après hydrolyse acide totale (A et B).

Nature de la protéine et temps de l'hydrolyse	pH	N (VAN SLYKE)	Acétone formée par oxydation chromique				Rapport $\frac{a}{b}$
			sous pression		directe		
			a	A	*b*	B	
A. — Globine de Bœuf :							
0	2,0	3,53	0,61	10,8	0,56	13,0	1,08
20 heures	2,0	3,53	0,79	13,9	0,61	14,2	1,30
40 —	2,0	3,70	0,88	15,5	0,56	13,0	1,57
120 —	2,0	3,83	0,83	14,6	0,56	13,0	1,48
360 —	1,9	4,15	0,88	15,5	0,64	14,9	1,37
B. — Globine de Cheval :							
0	2,6	2,52	0,33	4,7	0,33	6,0	1,00
80 heures	1,9	—	0,95	13,6	0,59	10,8	1,61
520 —	1,9	4,53	0,85	12,2	0,53	9,7	1,60
C. — Edestine :							
0	1,8	1,05	0,15	4,4	0,19	6,4	0,84
20 heures	1,8	1,72	0,30	8,9	0,26	8,7	1,15
40 —	1,8	1,72	0,42	12,5	0,28	9,8	1,50
60 —	1,8	1,72	0,42	12,5	0,28	9,8	1,50
120 —	1,8	1,72	0,38	11,3	0,21	7,1	1,80
Edestane :							
0	1,8	1,55	0,32	9,5	0,19	6,4	1,68
20 heures	1,8	1,75	0,38	11,3	0,15	5,0	2,53
60 —	1,7	1,93	0,34	10,1	0,15	5,0	2,20
160 —	1,6	1,93	0,38	11,3	0,21	7,1	1,80
Edestane :							
0	2,6	1,46	0,18	5,3	0,10	3,3	1,80
20 heures	2,0	2,01	0,25	7,4	0,14	4,7	1,78
60 —	2,0	1,84	0,48	14,3	0,18	6,0	2,66
160 —	2,0	1,92	0,40	11,9	0,14	4,7	2,85
D. — Caséine :							
0	2,1	0,71	0,19	3,0	0,13	3,8	1,46
20 heures	2,0	0,81	0,28	5,8	0,13	3,8	2,15
720 —	2,0	2,15	0,60	12,4	0,27	7,9	2,20
860 —	2,0	2,80	0,80	16,6	0,38	11,2	2,10
231 jours	2,9	4,55	1,06	22,5	0,96	28,4	1,10

Nous avons tracé, à partir de ces résultats, les courbes repréesntées par les figures 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 et 19.

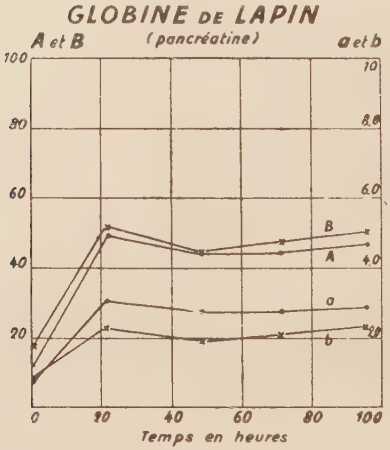


FIGURE 11. — *Acétone formée par oxydation chromique de la globine de Lapin à divers stades de l'hydrolyse* pancréatique.

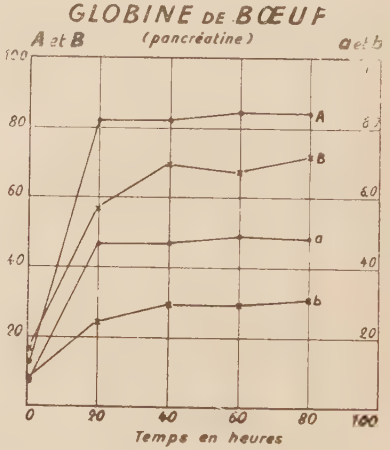


FIGURE 12. — *Acétone formée par oxydation chromique de la globine de Bœuf à divers stades de l'hydrolyse* pancréatique.

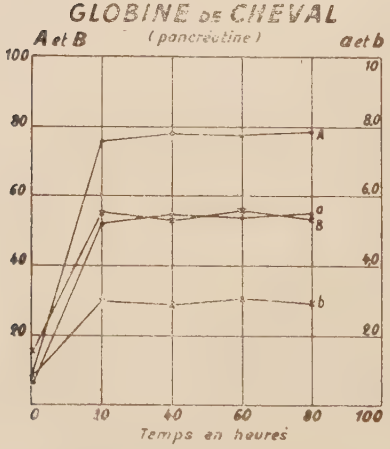


FIGURE 13. — *Acétone formée par oxydation chromique de la globine de Cheval à divers stades de l'hydrolyse* pancréatique.

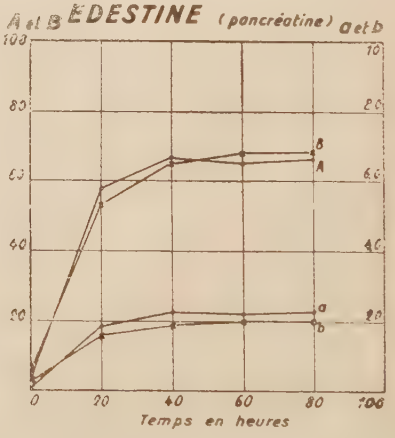


FIGURE 14. — *Acétone formée par oxydation chromique de l'édestine à divers stades de l'hydrolyse* pancréatique.

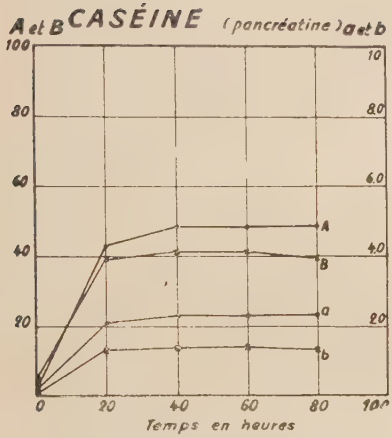


FIGURE 15. — *Acétone formée par oxydation chromique de la caséine à divers stades de l'hydrolyse* pancréatique.

Dans toutes ces figures les abscisses indiquent les temps en heures et les ordonnées l'acétone formée par oxydation chromique sous pression (*a*) et directe (*b*) en mg. p. 100 mg. de protéine et en p. 100 de l'acétone obtenue à partir des mêmes protéines soumises à l'hydrolyse acide totale (A et B).

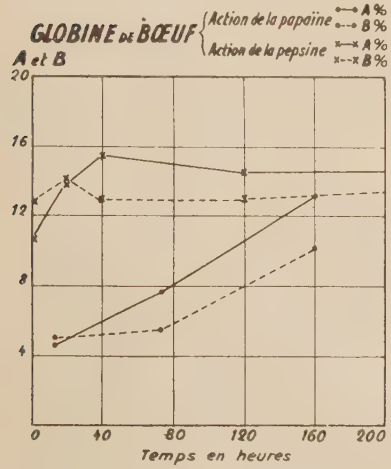


FIGURE 16. — *Acétone formée par oxydation chromique de la globine de Bœuf à divers stades des hydrolyses* papaïnique et pepsique.

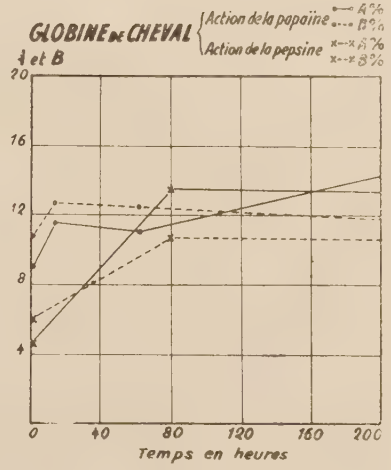


FIGURE 17. — *Acétone formée par oxydation chromique de la globine de Cheval à divers stades des hydrolyses* papaïnique et pepsique.

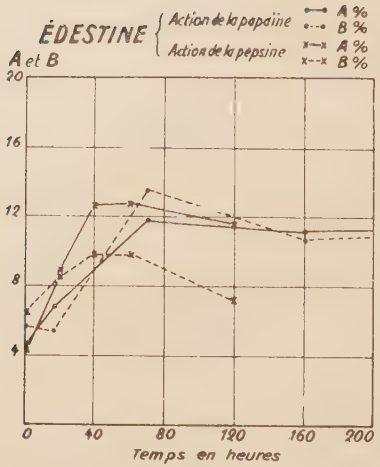


FIGURE 18. — *Acétone formée par oxydation chromique de l'édestine à divers stades des hydrolyses* papaïnique et pepsique.

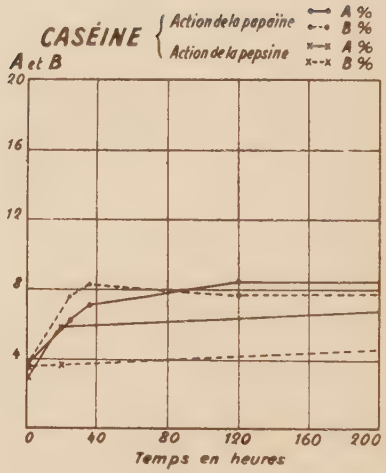


FIGURE 19. — *Acétone formée par oxydation chromique de la caséine à divers stades des hydrolyses* papaïnique et pepsique.

B. — Fractionnement par l'acide phosphotungstique des produits des hydrolyses papaïnique et pepsique de la caséine.

Nous avons réuni dans les tableaux XX (p. 99), XXI et XXII (p. 100) les résultats concernant ces recherches.

A partir des valeurs figurant dans les tableaux XVIII, XIX et XX, nous avons calculé certaines données (tableaux XXI et XXII) qui nous permettront d'interpréter et de discuter nos résultats.

L'examen du tableau XXI montre que l'hydrolyse acide des fractions non précipitées par le réactif phosphotungstique permet une augmentation du rendement très appréciable dans le cas de la digestion pepsique. Nous avons calculé les valeurs de ces augmentations, lesquelles figurent dans le tableau XXII.

Examen d'ensemble des résultats.

L'ensemble des documents réunis dans ces tableaux permet d'examiner l'action sur les protéines de chacun des enzymes mis en œuvre.

TABLEAU XX. — *Rendement en acétone* (mg. pour 100 mg. de protéine) *de l'oxydation chromique directe et sous pression et teneur en leucine et en valine totales p. 100* (*) *de différentes fractions des hydrolysats papaïnique* (178 jours) *et pepsique* (231 jours) *de caséine et de la caséine totalement hydrolysée par* SO_4H_2 *6 N* (40 heures).

Mode d'hydrolyse	Acétone formée par oxydation chromique		Leucine p. 100	Valine p. 100
	sous-pression	directe		
SO_4H_2 6 N.....	4,81	3,38	16,10	4,50
Papaïne + KCN ..	*a*. — Phosphotungstates solubles (72,0 p. 100 de N total) non hydrolysés.			
	1,95	1,25	—	—
	b. — Fraction *a* hydrolysée par SO_4H_2 6 N.			
	2,30	1,40	9,58	0,46
	c. — Phosphotungstates insolubles (28,0 p. 100 de N total).			
	0,17	0,16	—	—
Pepsine.....	*a*. — Phosphotungstates solubles (38.2 p. 100 de N total) non hydrolysés.			
	1,06	0,94	—	—
	b. — Fraction *a* hydrolysée par SO_4H_2 6 N.			
	2,06	1,27	8,43	0,69
	c. — Phosphotungstates insolubles (61,8 p. 100 de N total).			
	0,12	0,12	—	—

Comme pour l'examen des résultats de l'hydrolyse acide et alcaline de diverses protéines, nous baserons notre interprétation sur les quantités d'acétone fournies par l'oxydation chromique sous pression, *a*, et directe, *b*, exprimées en pour cent de protéine, les rendements en acétone (A et B pour cent de l'acétone totale libérée par hydrolyse sulfurique) ainsi que sur la valeur du rapport *a*/*b*. Les rendements en acétone (A p. 100 et B. p. 100) indiquent l'importance de la fraction des groupements isopropyliques libérée pour un temps donné, et les courbes représentant ces valeurs montrent la rapidité avec laquelle un enzyme rend ces groupements titrables. En effet,

(*) Le calcul de la teneur en leucine et en valine ne peut être fait avec précision qu'après hydrolyse totale, puisque les divers peptides de ces acides aminés ne donnent pas naissance à la même quantité d'acétone par groupement isopropyl lors de leur oxydation chromique.

TABLEAU XXI. — *Quantités d'acétone obtenues à partir de l'oxydation chromique de fractions séparées dans des milieux de digestion papaïnique et pepsique de 100 mg. de caséine* exprimées en p. 100 de la quantité fournie par 100 mg. de caséine totalement hydrolysée par l'acide sulfurique.

Produit étudié	Rendement en acétone de l'oxydation chromique	
	sous-pression	directe
A. Caséine non hydrolysée.....	3,9	3,8
B. Milieu de digestion papaïnique (178 jours)..	40,3	39,3
C. Milieu de digestion pepsique (231 jours)....	22,5	28,4
D. Fraction de B non précipitée PWo (papaïne)	40,6	37,0
E. Fraction D hydrolysée par SO_4H_2	47,7	41,4
F. Fraction de C non précipitée PWo (pepsine)	22,2	27,8
G. Fraction F hydrolysée par SO_4H_2.....	42,7	37,6
H. Fraction de B précipitée PWo (papaïne) ...	3,5	5,0
I. Fraction de C précipitée PWo (pepsine)....	2,5	3,5

TABLEAU XXII. — *Augmentation du rendement en acétone de l'oxydation chromique de produits de la digestion papaïnique et pepsique de 100 mg. de caséine soumis à l'hydrolyse acide complète* (p. 100 de l'acétone fournie par l'hydrolyse sulfurique de 100 mg. de caséine) *et teneurs en leucine et en valine de ces produits* (p. 100 des quantités présentes dans 100 mg. de caséine).

Produit étudié avant et après hydrolyse acide	Augmentation du rendement en acetone après oxydation chromique.		Leucine p. 100	Valine p. 100
	sous-pression	directe		
Caséine	96,1	96,2	100	100
Fraction D, non précipitée PWo (papaïne)	14,8	10,7	59,5	10,2
Fraction F, non précipitée PWo (pepsine)	48,6	26,8	52,3	15,3

ces derniers donnent naissance à de l'acétone, à la condition que les groupements aminés de la leucine ou de la valine soient libres. Leur étude fournit aussi des renseignements sur

la libération de ces acides aminés, puisque, toutes les fois que leur valeur dépasse 50 p. 100, on est certain de se trouver non plus seulement en présence de polypeptides, mais aussi de leucine et de valine.

L'étude du rendement en acétone de peptides de leucine et de valine, faite au début de ce chapitre, nous a permis de constater que la valeur du rapport a/b est variable suivant le type de peptide considéré. Cette valeur est de 1,4 à 3,0 dans le cas des peptides du type leucyl- ou valyl-R et peu différente de 1,0 dans celui des peptides du type R-leucine ou -valine. D'autre part, si l'on envisage le cas où un milieu d'hydrolyse ne renferme que de la leucine, la valeur de ce rapport est de 1,89 contre 0,89 quand ce milieu ne contient que de la valine. L'examen d'ensemble des résultats doit tenir compte de ces valeurs.

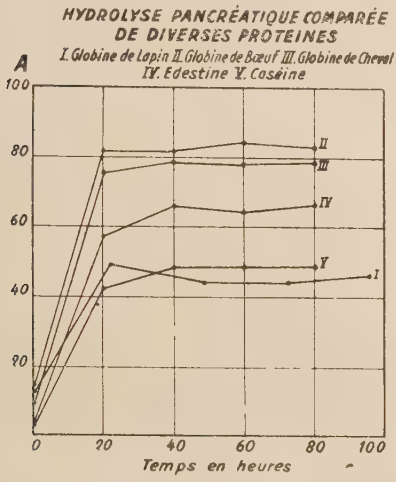


FIGURE 20. — *Acétone formée par oxydation chromique de diverses protéines à des stades successifs de l'hydrolyse* pancréatique.

A = p. 100 de l'acétone libérée après hydrolyse acide totale.

L'étude de l'hydrolyse de plusieurs types de protéines par la pancréatine, la papaïne et la pepsine permet de constater que le premier enzyme dédouble plus énergiquement les liaisons peptidiques auxquelles la leucine et la valine participent. De plus, l'action trypsique s'exerce différemment suivant la nature de la protéine mise en jeu (globines, édestine, caséine) puisque comme le montre l'examen de la figure 20 les taux d'acétone (A p. 100 de l'acétone totale) sont respectivement de 75,1 p. 100 dans le cas de la globine de Cheval, de 57,3 p. 100 dans celui de l'édestine et enfin de 42,8 p. 100 pour la caséine au bout de 20 heures. Ces valeurs augmentent encore de la vingtième à la quarantième heure (surtout pour l'édestine et la caséine).

Par contre, il n'est pas possible, pendant les 300 premières heures d'hydrolyse, d'établir une distinction aussi nette entre l'action de la papaïne et celle de la pepsine, bien que l'examen

des courbes tracées à partir des résultats de l'hydrolyse papaïnique et pepsique montre de petites différences d'action sur un même substrat.

I. — Action de la pancréatine sur les protéines.

De l'examen d'ensemble du tableau XVII et des figures 11, 12, 13, 14 et 15, il résulte que cet enzyme agit d'une manière différente sur les diverses protéines soumises à son action bien que, en général, les courbes présentent de grandes analogies avec celles obtenues au cours de l'hydrolyse acide, en ce sens qu'on assiste toujours à une augmentation brusque des taux d'acétone pendant les premières heures de l'hydrolyse (en quatre à six heures lorsqu'il s'agit d'une hydrolyse acide, en vingt heures quand il s'agit de l'hydrolyse pancréatique). Une différence se marque après ces temps : tandis que l'hydrolyse acide libère les deux tiers de l'acétone totale en six heures puis, progressivement, l'autre tiers, l'hydrolyse pancréatique n'évolue plus que lentement après vingt heures. Nous reviendrons sur ce point au cours de la discussion générale.

L'examen de la figure 11 (globine de Lapin) montre la mise en liberté de peptides pouvant appartenir à un mélange de leucyl-peptides et de valyl-peptides, ainsi que la libération de leucine ou de valine, si on tient compte, d'une part, de la valeur du rapport a/b, oscillant entre 1,30 et 1,38, et du fait que sensiblement 50 p. 100 de l'acétone totale (A p. 100 et B p. 100) sont libérées, ce qui dépasse le rendement en acétone de polypeptides de leucine ou de valine.

L'examen des courbes représentées dans la figure 12 (globine de Bœuf) montre déjà l'action différente de la pancréatine sur cette globine, laquelle se traduit par des rendements plus élevés. La pancréatine libère en vingt heures non seulement des polypeptides de leucine ou de valine mais encore des acides aminés. La valeur du rapport a/b, égale à 1,89, traduit donc certainement la présence de leucine dans le milieu d'hydrolyse. L'action de l'enzyme se poursuit encore, quoique à un très faible degré, pendant les heures qui suivent, où l'on constate un léger abaissement de la valeur du rapport a/b plaidant en faveur de l'apparition d'une petite quantité de peptides du type R-leucine ou R-valine ou de valine.

Les courbes de la figure 13 (globine de Cheval) diffèrent des

précédentes, toutefois elles traduisent aussi très nettement la mise en liberté précoce de leucine.

Après cet aperçu d'ensemble sur l'hydrolyse pancréatique de trois globines, examinons le cas de l'édestine, puis celui de la caséine. La première de ces protéines (fig. 14) est caractérisée par la valeur d'un rapport a/b sensiblement égal à 1,0, lequel conserve cette valeur pendant les quatre-vingt heures d'expériences. Il s'agit très vraisemblablement de l'apparition de peptides du type R-leucine ou -valine à côté de leucine et de valine libres, avec prédominance possible de ce dernier acide aminé sur l'autre. L'hydrolyse pancréatique de l'édestine est donc distincte de l'hydrolyse acide. La caséine (fig. 15) est, avec la globine de Lapin, la protéine qui se montre la plus résistante vis-à-vis de la pancréatine. L'augmentation assez rapide et progressive de la valeur du rapport a/b semble témoigner de la mise en liberté de la leucine.

II. — Action de la papaïne.

La spécificité des globines est marquée ici encore nettement du fait que la papaïne attaque plus rapidement la globine de Bœuf (tableau XVIII et fig. 16, 17) que celle de Cheval. Toutes les deux aboutissent cependant à la libération de leucine ou tout au moins de peptides du type leucyl- ou valyl-R, étant donnée la valeur du rapport a/b égale à 1,83 et 1,70 dans le cas de la première et à 1,56 et 1,59 dans celui de la seconde. Le rendement en acétone totale ne nous permet pas toutefois d'affirmer la présence de leucine seule, puisque la valeur de ce rendement est très faible dans les deux cas (13,2 p. 100 et 13,0 p. 100).

L'action sur l'édestine (fig. 18) nous apparaît, pendant les seize premières heures, comme ayant une tendance à la libération de polypeptides du type leucyl- ou valyl-R (rapport $a/b = 1{,}43$) suivie de celle de polypeptides du type R-leucine ou -valine (rapport $a/b = 1{,}0$). Cette constatation établit une différence entre l'action de la papaïne et celle de la pancréatine sur un même substrat.

Il est plus aisé de suivre la marche de l'hydrolyse sur la caséine (fig. 19), l'enzyme ayant alors agi plus longuement. Nous assistons, pendant les quarante premières heures, à la libération d'une petite quantité d'acétone laquelle demeure peu changée pendant au moins 300 heures pour faire une

ascension nette au bout de 178 jours. La valeur du rapport *a/b*, égale à 1,45, et la quantité d'acétone totale libérée à ce moment (A p. 100 = 40,3) laissent supposer que le milieu d'hydrolyse renferme non seulement des peptides, mais de la leucine ou de la valine libres.

III. — Action de la pepsine.

La pepsine agissant sur la globine de Bœuf permet de libérer de l'acétone (sous pression et directe) en quantité sensiblement supérieure à celle obtenue après action de la papaïne. Le rapport *a/b* est cependant plus faible dans le cas de la pepsine, ce qui est une manifestation d'un processus différent de libération de polypeptides dans lesquels sont engagées la leucine et la valine. La valeur de ce rapport étant égale à 1,83 et 1,70 dans le cas de la papaïne, contre 1,57 et 1,48 dans celui de la pepsine, il semble que le premier enzyme libère soit des peptides du type leucyl- ou valyl-R, soit des quantités plus importantes de leucine dans un temps sensiblement égal, son mode d'action étant alors différent.

Cette différence d'action se manifeste encore très nettement en comparant les actions de la papaïne et de la pepsine sur la globine de Cheval (fig. 17), en ce sens que l'augmentation de la quantité d'acétone libérée par la pepsine pendant les quatre-vingt premières heures est un peu plus importante : on passe, en effet, de 4,7 p. 100 (début) à 13,6 p. 100 (80 heures), contre 9 p. 100 à sensiblement 11 p. 100 (voir tableaux XVIII et XIX). Toutefois, les quantités d'acétone totale et la valeur du rapport *a/b* sont du même ordre de grandeur après une durée d'hydrolyse plus longue.

Quant à l'action de la pepsine sur l'édestine, elle libère certainement des peptides du type leucyl- ou valyl-R dès la quarantième heure d'hydrolyse, ou un peu de leucine, et son action s'arrête après ce temps. Afin de savoir dans quelle mesure la pepsine pouvait attaquer l'édestine après transformation de celle-ci en édestane, par chauffage au bain-marie bouillant en milieu légèrement chlorhydrique, nous avons réalisé cette expérience et nous avons fait agir la pepsine à deux pH différents (1,8 et 2,6). Dans un cas, la pepsine n'a pas augmenté le rendement en acétone et la valeur du rapport *a/b* est restée élevée ; dans l'autre cas (pH = 2,6), la pepsine a agi en faisant passer de 5,3 à 11,9 p. 100 la quantité d'acétone

totale (A p. 100), en même temps que la valeur du rapport *a/b* traduisait la présence de peptides du type leucyl-R ou d'un peu de leucine. Si l'édestine et l'édestane fournissent, par action de la pepsine, la même quantité d'acétone totale (11,3 p. 100 pour l'édestine, et 11,3 et 11,9 p. 100 pour l'édestane) la valeur du rapport *a/b* est cependant beaucoup plus élevée dans le cas de l'édestane, ce qui indique un processus différent d'action de la pepsine sur l'un et l'autre corps.

L'hydrolyse de la caséine met assez rapidement en liberté des peptides du type leucyl- ou valyl-R, étant donnée la valeur élevée du rapport *a/b* (2,15 — 2,20 — 2,10). Toutefois, en une période de temps plus courte, la papaïne libère davantage d'acétone. Après 231 jours d'hydrolyse par la pepsine, la valeur de ce rapport ayant diminué (1,10), il est fort possible que l'enzyme ait agi en libérant soit des peptides du type R-leucine ou -valine, soit de la valine. Nous allons du reste essayer d'approfondir la question de l'action de la papaïne et de la pepsine sur la caséine.

On se rend compte par cet examen d'ensemble que, si l'on peut considérer l'action de la pancréatine comme très rapide et arrêtée par atteinte d'un équilibre, il n'en est pas de même de celle des deux autres protéinases, lesquelles continuent à libérer progressivement des corps générateurs d'acétone pendant des mois. Nous avons été amenés à penser que, d'après la valeur du rapport *a/b*, nous nous trouvions probablement en présence de polypeptides de l'un ou de l'autre type, ou même, peut-être, de leucine ou de valine, sans pouvoir toutefois être affirmatifs sur ce point étant donnée la complexité du milieu d'hydrolyse. Cette étude ne nous paraîtrait pas suffisamment poussée, si nous ne recherchions pas dans quelle mesure la papaïne et la pepsine détachent d'une molécule protéique, d'une part des peptides plus ou moins longs dans la constitution desquels entrent la leucine ou la valine et, d'autre part, ces mêmes acides aminés. Aussi, avant d'aborder une discussion générale sur les résultats précédents, croyons-nous utile de les compléter par l'étude des fractions résultant de l'action du réactif phosphotungstique sur les hydrolysats pepsique et papaïnique de la caséine avant et après hydrolyse sulfurique.

IV. — Fractionnement phosphotungstique des produits de l'hydrolyse papaïnique ou pepsique.

L'examen des valeurs figurant dans les tableaux XVIII, XIX, XX et XXII montre que la caséine (comme les autres protéines) ne donne naisance qu'à de petites quantités d'acétone après action de l'acide nitreux et de l'acide chromique. L'hydrolyse pepsique ou papaïnique prolongée dédouble des liaisons peptidiques en rapport direct avec la leucine ou la valine, ce qui se traduit par l'augmentation du rendement en acétone, bien que cette libération demande plusieurs mois et ne revête pas le même aspect suivant la nature de l'enzyme qui la provoque. L'action de la pepsine est plus lente et moins profonde ; l'augmentation du rendement en acétone de la fraction D (tableau XXII), après hydrolyse, est moins importante que celle de la fraction F laquelle relève de l'action pepsique. Ces deux fractions renferment sensiblement la même proportion de leucine (59,5 p. 100 et 52,3 p. 100), d'ailleurs très élevée, tandis que leur teneur en valine est plutôt basse (10,2 et 15,3 p. 100 de la quantité de valine totale).

Quant aux produits précipités par l'acide phosphotungstique et qui représentent une quantité importante de la protéine totale, ils renferment de la leucine et de la valine dans des combinaisons probablement semblables à celles présentes dans la caséine, puisque, dans un cas comme dans l'autre, le groupement isopropylique n'est pratiquement pas générateur d'acétone par les actions successives de l'acide nitreux et de l'acide chromique.

Tous ces faits apportent des renseignements sur les positions respectives de la leucine et de la valine dans les molécules protéiques et l'action des protéinases. Il convient de les discuter afin d'en dégager le sens.

Discussion générale des résultats.

Nous discuterons plus particulièrement ici les points suivants : 1° Evolution générale de l'hydrolyse enzymatique dans le cas de chaque enzyme. 2° Libération de la leucine et de la valine au cours de l'hydrolyse enzymatique et chimique. 3° Diversité de structure des différentes protéines et protéolyse enzymatique.

I. — Evolution générale de l'hydrolyse enzymatique et diversité d'action de chaque enzyme.

Si nous comparons les courbes d'actions de la pancréatine, de la papaïne et de la pepsine sur diverses protéines, nous constatons une grande différence d'action de la pancréatine d'une part, de la papaïne et de la pepsine d'autre part. La première attaque très vite le substrat protéique et, en vingt heures d'hydrolyse, le taux d'acétone libérée oscille entre 50 et 80 p. 100 du taux d'acétone totale. Passé ce temps, l'enzyme n'agit plus que très lentement (équilibre).

Un caractère commun à ces enzymes est la libération très rapide, pendant les vingt ou quarante premières heures, d'une certaine quantité de groupements cétogènes. Le palier observé avec la pancréatine manifeste également sa présence dans le cas de la papaïne et de la pepsine et, si ces deux dernières protéinases attaquent moins fortement le substrat protéique, elles ont ce caractère commun avec la pancréatine de dédoubler rapidement des liaisons peptidiques intéressant la leucine ou la valine ; par la suite, la diversité d'action de ces enzymes se fait jour.

Tandis que l'action de la pancréatine s'arrête rapidement, celle de la papaïne et de la pepsine se poursuit, lentement, pendant plusieurs mois, pour dédoubler des liaisons peptidiques parmi lesquelles certaines intéressent le groupement isopropylique de la leucine ou de la valine, ce qui permet l'augmentation du rendement en acétone par oxydation chromique (40,3 p. 100 de l'acétone totale dans le cas de la papaïne et 22,5 p. 100 dans celui de la pepsine).

L'augmentation des quantités d'azote aminé (tableaux XVII, XVIII et XIX) et d'acétone sous pression dans les hydrolysats pancréatique, papaïnique et pepsique, fait immédiatement ressortir le mode d'action différent de la pancréatine d'une part, de la pepsine et de la papaïne d'autre part. Tandis qu'avec la pancréatine l'augmentation du rendement en acétone est, par exemple, neuf fois plus forte (cas de la globine de Cheval), avec une augmentation de l'azote aminé qui est presque quadruple, on constate seulement une augmentation d'acétone qui n'est même pas deux fois plus forte pour une augmentation de la quantité d'azote aminé presque triple avec la papaïne. On observe un fait semblable à ce qui se passe avec

ce dernier enzyme quand on examine les résultats de l'hydrolyse pepsique. A égalité d'azote aminé dégagé (van Slyke), la pancréatine rend les groupements isopropyliques beaucoup plus facilement titrables ; par conséquent, les points d'attaque d'une même protéine sont différents suivant l'enzyme mis en jeu. Il semble que la papaïne et la pepsine évitent certaines liaisons auxquelles participent la leucine et la valine.

II. — Libération de la leucine et de la valine au cours des hydrolyses enzymatique et chimique, et constitution générale des protéines.

Les résultats présentés dans les divers tableaux et l'aspect des courbes d'hydrolyse montrent que l'action de la pancréatine dépasse le stade de polypeptides, même simples, pour libérer des acides aminés ; en effet, si l'hydrolyse pancréatique arrêtait son action après avoir libéré des peptides du type leucyl- ou valyl-R, ou R-leucine ou -valine, le rendement en acétone (A p. 100 de l'acétone totale) n'atteindrait pas les valeurs de 83,2 p. 100 (globine de Bœuf) ou de 78,9 p. 100 (globine de Cheval), d'après ce que nous savons du rendement en acétone des polypeptides de leucine ou de valine (voir p. 71).

Une comparaison avec les résultats obtenus au cours de l'hydrolyse acide et alcaline s'impose. Cette comparaison doit porter sur les quantités d'acétone (A p. 100) libérées après un certain temps et sur la valeur du rapport a/b. Tandis que les quantités d'acétone (A p. 100) mises en liberté après 2 heures d'hydrolyse acide (52 p. 100) et 22 heures d'hydrolyse pancréatique (49,1 p. 100) sont sensiblement égales dans le cas de la globine de Lapin, il n'en est plus de même dans ceux de l'édestine et de la caséine : en effet, après 2 heures d'hydrolyse acide on trouve un rendement en acétone de 38,2 p. 100 contre 57,3 p. 100 et, après hydrolyse pancréatique de l'édestine, un rendement en acétone de 39,2 p. 100 contre 42,8 p. 100 pour la caséine. D'une manière uniforme, la valeur du rapport a/b est toujours plus basse après 20 heures d'hydrolyse pancréatique qu'après 2 heures d'hydrolyse acide ou alcaline, cette valeur est de 1,30 (globine de Lapin), 1,23 (édestine) et 1,54 (caséine) contre 1,43 (globine de Lapin), 1,66 (édestine) et 1,68 (caséine). Il ressort de cette comparaison que la pancréatine et l'hydrolyse acide ont une action un peu différente pour dédoubler les liaisons peptidiques, mais une

grande analogie si l'on considère l'aspect général de cette action que nous pouvons résumer ainsi : l'hydrolyse pancréatique et l'hydrolyse acide libèrent très rapidement une fraction importante (50 p. 100 à 80 p. 100) des groupements $-NH_2$ faisant partie de liaisons peptidiques, ce qui rend les groupements isopropyliques dosables. Ce que nous savons du rendement en acétone des peptides de leucine d'une part, et de la valeur du rapport a/b d'autre part, nous indique très clairement que de la leucine est toujours libérée rapidement au début de ces deux hydrolyses.

Le problème est plus délicat en ce qui concerne la libération de ces acides aminés par la papaïne et la pepsine. La valeur assez basse du taux d'acétone (22,5 p. 100 de l'acétone totale) dans le cas de la pepsine semble indiquer que celle-ci libère des polypeptides dans lesquels des groupemnts isopropyliques sont voisins de $-NH_2$ libres, sans toutefois pouvoir affirmer la mise en liberté de leucine ou de valine. La même question se pose à propos de la libération de ces acides aminés par action de la papaïne. Celle-là apparaît comme très probable si on tient compte d'une part du rendement assez élevé en acétone (40,3 p. 100 de l'acétone totale ; voir tableau XVIII), de la valeur du rapport a/b égale à 1,45 et, d'autre part, de la faible augmentation du rendement en acétone après hydrolyse acide de la fraction non précipitée par le réactif phosphotungstique (voir tableau XXII).

Nous avons eu recours à l'étude des fractions résultant de l'action de ce réactif pour essayer d'interpréter les actions de la pepsine et de la papaïne, afin de déterminer dans quelle mesure ces enzymes libèrent des peptides plus ou moins complexes ou des acides aminés et de connaître approximativement l'importance de chacun d'eux.

La formation d'acétone par oxydation chromique des polypeptides n'ayant lieu que si le groupement $-NH_2$ de la leucine et de la valine est libre, il est certain que tel n'est pas le cas des protéines intactes, puisque nous n'obtenons que des quantités très faibles d'acétone. La pepsine et la papaïne dédoublent une partie de ces liaisons, comme en témoignent l'augmentation du rendement en acétone par oxydation chromique et celle du dégagement d'azote aminé (VAN SLYKE), avec les restrictions que nous avons faites à ce sujet dans l'un des paragraphes précédents. Toutefois, ces deux enzymes agissent

suivant des modalités différentes. La papaïne libère de la leucine en abondance accompagnée de polypeptides de poids moléculaire assez faible ; ceux-ci renferment de la leucine, si l'on en juge par l'augmentation du rendement, du reste très faible, après hydrolyse sulfurique de la fraction non précipitée par le réactif phosphotungstique. Un peu de valine (0,46 p. 100) soit libre, soit combinée accompagne le mélange précédent.

La pepsine donne des peptides plus complexes, dont l'hydrolyse sulfurique augmente d'une manière importante le rendement en acétone (voir tableaux XXI et XXII) (48,6 p. 100 sous pression, et 26,8 p. 100 après oxydation et distillation directe). Celui-ci, inférieur au rendement qui serait donné si on se trouvait en présence de polypeptides seuls, apporte la preuve que, dans l'hydrolysat pepsique de la caséine, il existe à la fois des polypeptides, de la leucine et peut être un peu de valine libres.

Les quantités de leucine obtenues après hydrolyse sulfurique des fractions D et F non précipitées par le réactif phosphotungstique (tableau XX) sont sensiblement équivalentes. Aussi, pensons nous que la papaïne détache les acides aminés en bout de chaîne ou apparaissant en bout de chaîne à la suite de la rupture de liaisons peptidiques, tandis que la pepsine sépare certaines chaînes peptidiques assez courtes à partir de chaînes fondamentales, les premières renfermant, comme les secondes du reste, de la leucine et de la valine.

Il n'apparaît pas que ces enzymes manifestent une certaine spécificité pour des liaisons peptidiques auxquelles participent la leucine et la valine ; en effet, les rendements en acétone (*a* et *b*) ne sont pas très importants au début de l'hydrolyse pepsique et papaïnique, et le dégagement d'azote aminé évolue plus rapidement que la libération de groupements cétogènes. La mise en liberté de leucine et de valine semble résulter de leur position (et non de leur nature) à l'extrémité de chaînes secondaires plus qu'en bout de chaînes fondamentales. Si la pepsine paraît se comporter comme une « endopeptidase », en ce sens qu'elle hydrolyse surtout des liaisons éloignées des extrémités de chaînes peptidiques, la papaïne présente à la fois une activité « endopeptidasique » et « exopeptidasique » ; en effet, le second enzyme libère en quantité appréciable des acides aminés, dont la leucine, à côté de peptides assez simples.

Le fractionnement par l'acide phosphotungstique des hydrolysats papaïnique et pepsique de la caséine a permis de constater qu'une fraction importante (50 p. 100) de la leucine totale et une faible partie (10 à 15 p. 100) de la valine totale sont libérées à la suite de l'action des deux protéinases. Il en résulte que ces deux acides aminés n'occupent pas une position identique dans la molécule protéique. La moitié au moins de la leucine doit exister à l'extrémité de chaînes fondamentales ou entrer dans la constitution de chaînes secondaires (comme la tyrosine, la phénylalanine et le tryptophane). L'autre moitié de la leucine et une grande partie de la valine, non libérables par la papaïne et la pepsine, doivent occuper une position plus interne. Aussi doit-on considérer la molécule protéique comme formée par deux fractions, l'une périphérique, « exopeptidique », à la constitution de laquelle participent des chaînes peptidiques plus courtes, plus labiles, et où nous trouvons une partie de la leucine, l'autre ,« nucléaire », plus résistante aux agents d'hydrolyse et contenant de la leucine avec la presque totalité de la valine. C'est sans doute grâce à cette position périphérique de la leucine que Schönheimer, Rittenberg et Rattner [148] ont pu mettre en évidence le processus physiologique de transpeptidation en expérimentant avec de la *l*-leucine contenant de l'azote ($_{15}N$) et de l'hydrogène ($_{2}H$) lourds.

III. — Diversité de structure des différentes protéines et protéolyse enzymatique.

Si l'on envisage la molécule protéique comme comprenant deux régions : l'une périphérique, dont les constituants sont labiles (extrémités de chaînes polypeptidiques ou acides aminés en chaînes latérales) et l'autre, « nucléaire », plus résistante aux agents d'hydrolyse (Kossel), cette conception n'exclut pas la diversité de structure de différentes protéines. En d'autres termes, toutes les globines étudiées (globines de Lapin, de Bœuf et de Cheval) présenteraient une région périphérique dans laquelle la leucine est facilement mise en liberté par hydrolyse, soit chimique soit enzymatique, et où l'on trouve peu de valine, tandis que la région « nucléaire » contiendrait de la leucine et la presque totalité de la valine solidement fixées ; cependant, la leucine et la valine périphériques, concourant à la constitution des chaînes peptidiques secondai-

res, ne sont pas distribuées identiquement dans ces trois globines. C'est ce que prouve l'étude de l'hydrolyse enzymatique. En effet, les courbes d'hydrolyse ne présentent pas le même aspect suivant qu'elles intéressent l'une ou l'autre de ces trois globines. Non seulement les rendements en acétone (A p. 100), mais encore les valeurs du rapport *a/b* sont différents après des temps d'hydrolyse égaux et ceci ne peut être que la manifestation d'une structure différente chez des protéines pourtant très voisines. La même constatation s'impose quand on compare les courbes de l'hydrolyse pancréatique de l'édestine et de la caséine ; elle nous conduit à une conclusion semblable. Bien que l'action de l'hydrolyse pepsique et papaïnique soit moins intense que celle de l'hydrolyse pancréatique, l'aspect des courbes est encore suffisamment différent pour montrer l'existence d'une structure qui varie d'une protéine à l'autre. La diversité des protéines ne réside donc pas seulement dans leurs différences de composition en acides aminés mais aussi dans celles de leur structure moléculaire.

Conclusions du chapitre III.

A.

L'étude du rendement en acétone des peptides du type leucyl-R (ou valyl-R) et R-leucine (ou R-valine) montre que sa valeur et celle du rapport *a/b* est beaucoup plus élevée chez les premiers. La transformation du groupement isopropylique en acétone par oxydation chromique est donc liée à la présence du groupement α aminé libre. L'application des données obtenues à l'étude de mélanges de leucine et de valine et de polypeptides le renfermant a pu être envisagée à la suite de nos expériences.

B.

1° Les protéines non hydrolysées, oxydées par l'acide chromique dans les conditions où la leucine et la valine libres donnent naissance à de l'acétone, ne sont génératrices de celle-ci qu'en quantité minime. Le fait que les valeurs initiales sont toujours très faibles est probablement dû au blocage presque complet des $-NH_2$ de toutes les molécules de leucine et de valine. Toutefois, ces valeurs ne sont pas identiques dans toutes

les protéines : elles sont plus élevées dans la globine que dans les autres protéines.

2° Le rendement en acétone de l'oxydation des hydrolysats augmente progressivement au cours de l'hydrolyse et les courbes qui traduisent ses variations ne sont pas rigoureusement identiques selon que des acides ou des bases ont été mis en œuvre. Ce fait traduit la diversité du mode de décomposition des molécules protéiques par les différents réactifs.

3° Au début de l'hydrolyse, l'écart entre *a* (acétone sous pression) et *b* (acétone directe) pour 100 de protéine est plus marqué qu'après huit heures, sauf dans le cas de la zéine, très riche en leucine et pauvre en valine, où, au contraire, l'écart n'augmente que très faiblement (hydrolyse acide), ou se maintient après la huitième heure (hydrolyse alcaline). La leucine étant caractérisée par une valeur du rapport *a/b* beaucoup plus élevée que celle propre à la valine, la libération de la leucine doit être considérée comme plus rapide que celle de la valine.

4° Dans tous les cas, une fraction importante (70 p. 100 environ) des groupements isopropyliques devient dosable dans les premières heures d'hydrolyse, tandis que le reste ne le devient que beaucoup plus tard. D'une manière très générale, on observe pendant les quatre premières heures l'augmentation de la teneur du milieu en polypeptides du type leucyl-R (ou valyl-R) ou de leucine. Il y a donc deux sortes de combinaisons auxquelles participent la leucine et la valine, les unes assez fragiles et à la périphérie de la molécule, les autres plus internes (noyau de Kossel) et ne s'hydrolysant que difficilement.

5° Les courbes diffèrent selon la protéine étudiée, ce qui traduit les différences de structure. La globine est relativement plus labile que la caséine et l'édestine, et celle-ci plus que la zéine. La libération d'acétone est différente au début de l'hydrolyse pour ces protéines : très rapide avec la globine, un peu moins avec la caséine, moins encore avec l'édestine, elle est plus lente et plus régulière avec la zéine.

C.

1° Une partie importante des liaisons peptidiques des protéines est rapidement hydrolysable par action de la pancréatine comme par celle des agents chimiques.

2° La pancréatine libère très rapidement des groupements aminés voisins de groupements isopropyliques, comme en témoigne l'augmentation rapide du rendement en acétone dont la valeur, atteignant jusqu'à 80 p. 100 de l'acétone formée après hydrolyse totale, apporte la preuve de la mise en liberté de leucine et de la valine.

3° L'hydrolyse pancréatique de globines diverses traduit la spécificité de celles-ci, la globine de Lapin étant plus résistante à l'action des enzymes que celle du Bœuf ou du Cheval.

4° La papaïne et la pepsine attaquent une fraction beaucoup plus faible des liaisons peptidiques. La première libère une quantité importante de leucine et probablement une petite quantité de valine et de polypeptides à chaîne courte renfermant ces acides aminés. La seconde donne surtout naissance à des polypeptides contenant de la leucine en même temps qu'à des produits de poids moléculaire plus élevé et à de petites quantités de leucine. Les hydrolyses pepsique et papaïnique ne sont pas spécifiques de liaisons auxquelles participent la leucine et la valine.

5° Une fraction importante de la leucine occupe, dans la caséine, une position en bout de chaîne, tandis que la majeure partie de la valine et l'autre fraction de la leucine occupent une position « nucléaire ».

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

I.

La mise au point d'une méthode de dosage spécifique de la leucine et de la valine dans les protéines, basée sur la transformation des groupements isopropyliques en acétone après désamination de ces acides aminés et oxydation chromique, nous a permis de doser avec une précision de ± 5 p. 100 ces corps dans les produits de l'hydrolyse acide totale de diverses protéines.

Dans le cas des protéines très riches en leucine et très pauvres en valine, l'application de cette méthode nécessite un enrichissement préalable relatif en valine, que l'on réalise en mettant à profit la grande solubilité dans l'eau du sel de cuivre de la valine et la très faible solubilité du sel de cuivre de la leucine dans le même milieu.

II.

L'application de cette méthode de dosage de la leucine et de la valine à diverses protéines en vue d'obtenir des renseignements soit sur leur spécificité, dans le cas des chromoprotéides, soit sur leur composition, ainsi que sur leur aptitude à couvrir le besoin de l'organisme en valine et en leucine, nous a conduit aux résultats suivants :

1° Les hémoglobines sanguines de diverses espèces animales appartenant à la classe des Mammifères présentent des différences de teneur en leucine et en valine relevant de leur spécificité.

L'érythrocruorine d'Arénicole (*Arenicola marina*), considérée à juste titre comme faisant partie d'un groupe particulier de pigments hématiniques (érythrocruorines) est beaucoup

moins riche en leucine que les hémoglobines sanguines des Mammifères.

2° Les hémoglobines musculaires de Mammifères sont plus pauvres à la fois en leucine et en valine que les hémoglobines sanguines des animaux de même espèce.

3° Les hémocyanines d'espèces animales appartenant à divers groupes zoologiques (Mollusques, Crustacés et Mérostomates) présentent des teneurs très variables en leucine et en valine d'une espèce à l'autre et pour un même groupe. Toutefois, il existe une certaine homogénéité de composition dans chacun de ces groupes. Ce fait justifie la classification de ces pigments suivant le groupe zoologique dont ils proviennent en : hémocyanines de Mollusques, hémocyanines de Crustacés et hémocyanine de Mérostomate. En effet, tandis que le taux de leucine oscille autour de 10,0 pour cent dans le cas des hémocyanines de Mollusques, celui de l'hémocyanine de Crustacés atteint 15,0 pour cent ; enfin, l'hémocyanine de Limule est caractérisée par un taux de leucine très bas (7,69 p. 100), ce qui complète les arguments biochimiques antérieurs justifiant la séparation de la Limule en une classe distincte (classe des Mérostomates, ordre des Xiphosures) de celle des Crustacés et des Arachnides.

4° Non seulement les taux de leucine et de valine, mais aussi ceux d'alanine reflètent les caractères de spécificité propres à chaque pigment sanguin considéré à l'échelle de l'espèce animale, que celui-ci soit ou non un chromoprotéide à groupement prosthétique tétrapyrrolique.

5° Le calcul de la fréquence (Bergmann et Niemann) de la leucine et de la valine dans les pigments respiratoires montre la place importante occupée par le premier acide aminé. La valeur de la somme : nombre de molécules de leucine + nombre de molécules de valine, dans une unité de Svedberg (17.000), valeur qui est d'environ 35 molécules dans les hémoglobines sanguines et de 25 molécules dans les hémoglobines musculaires, permet de penser que la valine et la leucine peuvent se remplacer mutuellement dans ces protéines grâce à leur analogie de structure (groupement isopropylique en bout de chaîne).

III.

Exception faite pour la fibroïne, toutes les protéines analysées (chromoprotéides, euprotéides et phosphoprotéides) sont beaucoup plus riches en leucine qu'en valine. Le dosage de ces acides aminés dans les trois groupes de protéines cités nous a permis d'apporter une contribution à la teneur de ces dernières en leucine et en valine. Toutefois, ces teneurs ne peuvent pas constituer une base de classification des divers types de protéines étudiés (scléroprotéides, prolamines, albumines, globulines).

IV.

La méthode de dosage de la leucine et de la valine appliquée à des peptides de leucine et de valine du type leucyl-R (ou valyl-R) ou R-leucine (ou R-valine) met en évidence des rendements en acétone beaucoup plus élevés dans le cas des premiers. La valeur du rapport : acétone obtenue par oxydation sous pression/acétone obtenue par oxydation et distillation directe, (a/b), est toujours supérieure à 1,4 dans le cas des peptides du type leucyl- ou valyl-R ; elle est voisine de 1,0 dans celui des peptides du type R-leucine ou -valine. De même, si l'on considère les rendements de la leucine et de la valine seules on trouve comme valeurs du rapport a/b respectivement 1,89 et 0,89. Ces données facilitent l'interprétation des courbes d'hydrolyse chimique ou enzymatique de diverses protéines et permettent de suivre la libération de la leucine et de la valine ou de peptides les contenant.

V.

Le dosage des groupements isopropyliques de la leucine et de la valine dans des protéines non hydrolysées ne fournit que des quantités très faibles d'acétone. Les groupements $-NH_2$ de ces acides aminés sont donc bloqués dans des liaisons peptidiques.

Les processus d'attaque d'une même protéine par hydrolyse acide ou alcaline ne sont pas identiques, comme le montrent les courbes de rendements en acétone (A p. 100 et B p. 100, *a* p. 100 et *b* p. 100).

L'hydrolyse acide et l'hydrolyse alcaline commencent par

libérer très rapidement une fraction importante (70 p. 100 environ) des groupements isopropyliques, dont la majeure partie provient de la leucine, pour ne libérer que beaucoup plus lentement l'autre fraction. Ce résultat est la conséquence d'une structure hétérogène des protéines en ce qui concerne les acides aminés étudiés ; la molécule protéique peut en effet être considérée comme constituée par une région « nucléaire », plus résistante aux agents chimiques d'hydrolyse, et une région « périphérique », facilement dissociée en ses constituants par ces mêmes agents.

A ce schéma général de structure des protéines doit s'ajouter la notion de diversité de constitution de chaque protéine, du fait que les courbes d'hydrolyse ne sont identiques en aucun des cas étudiés (caséine, édestine, globines, zéine).

VI.

L'hydrolyse enzymatique de diverses protéines par la pancréatine présente de grandes analogies avec celle réalisée par des agents chimiques. Elle libère très rapidement des groupements aminés voisins de groupements isopropyliques, ce qui rend ces derniers dosables. L'importance du taux d'acétone totale d'une part (50 p. 100 à 80 p. 100), de la valeur du rapport a/b d'autre part, prouvent la mise en liberté précoce de leucine.

L'hydrolyse pancréatique de globines diverses met en évidence les caractères spécifiques de celles-ci.

La papaïne attaque une fraction beaucoup plus faible des liaisons peptidiques ; toutefois, son action aboutit à la libération de polypeptides de poids moléculaire assez faible et d'une quantité importante de leucine, tandis que la pepsine, dont l'action est aussi moins profonde que celle de la pancréatine, donne naissance à des peptides de poids moléculaire plus élevé et à une petite quantité de leucine.

L'attaque des protéines par la papaïne et la pepsine n'est pas spécifique de liaisons auxquelles participent la leucine et la valine.

L'étude comparée des hydrolyses chimique et enzymatique des protéines met en relief la libération précoce de leucine, une fraction importante de celle-ci occupant une position en bout de chaîne, tandis que l'autre fraction et une grande

partie de la valine sont engagées dans les chaînes peptidiques fondamentales ou « nucléaires ». Elle montre aussi la diversité de structure de protéines pouvant appartenir à un même groupe, en sorte que cette diversité relève à la fois d'une différence dans la teneur en acides aminés (composition de la protéine) et dans la position de ceux-ci dans la molécule (structure de la protéine).

Marseille, le 25 février 1944.

Vu : *Le Rapporteur*,
JEAN ROCHE.

Marseille, le 1er mars 1944.

Vu : *Le Doyen*,
G. CORROY.

Aix, le 3 mars 1944.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie d'Aix-Marseille,
P. E. GAU.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Abderhalden (E.). — Hydrolyse des kristallisiertes Oxyhämoglobins aus Pferdeblut. *Z. physiol. Chem.*, 1903, **37**, 484-494.
2. Abderhalden (E.). — Hydrolyse des Edestins. *Z. physiol. Chem.*, 1903, **37**, 499-505.
3. Abderhalden (E.). — Nachtrag zur Hydrolyse des Edestins. *Z. physiol. Chem.*, 1903, **40**, 249-250.
4. Abderhalden (E.). — Abbau und Aufbau der Eiweisskorper im tierischen Organismus. Hydrolyse des Serumglobulins. *Z. physiol. Chem.*, 1905, **44**, 17-52.
5. Abderhalden (E.). — *Biochemisches Handlexikon*, 1911, IV Band, 85.
6. Abderhalden (E.). — *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, Berlin, 5e éd., 1920.
7. Abderhalden (E.). — *Biochemisches Handlexikon*, 1924, XI Band, 119 et 122.
8. Abderhalden (E.) et Herrick (J. B.). — Beitrag zur Kenntniss der Zusammensetzung des Conglutins aus Samen von *Lupinus*, *Z. physiol. Chem.*, 1905, **45**. 479-485.
9. Abderhalden (E.) u. Baumann (L.). — Die Monoaminosäuren des krystallisierten Oxyhämoglobins. *Z. physiol. Chem.*, 1907, **51**, 397-403.
10. Abderhalden (E.) u. Behrend (L.). — Vergleichende Untersuchungen über die Zusammensetzung und den Aufbau verschiedener Seidenarten. *Z. physiol. Chem.*, 1909, **59**, 236-238.
11. Abderhalden (E.) u. Le Count (E. R.). — Die Monoaminosäuren des Keratins aus Gänsefedern. *Z. physiol. Chem.*, 1905, **46**, 40-46.
12. Abderhalden (E.) und Pregl (F.). — Die Monoaminosäuren des krystallisierten Eieralbumins. *Z. physiol. Chem.*, 1905, **46**, 24-30.
13. Abderhalden (E.) u. Przibram (H.). — Die Monoaminosäuren des Albumins aus Kuhmilch. *Z physiol. Chem.*, 1907, **51**, 409-414.
14. Abderhalden (E.) u. Reinbold (B.). — Die Monoaminosäuren des Edestins aus Sonnenblumensamen und dessen Verhalten gegen Pankreassaft. *Z. physiol. Chem.*, 1905, **44**, 284-293.
15. Abderhalden (E.) u. Rostoski (O.). — Die Monoaminosäuren des Edestins aus Baumwollsamen und dessen Verhalten gegen Magensaft. *Z. physiol. Chem.*, 1905, **44**, 265-275.
16. Abderhalden (E.) u. Samuely (F.). — Die Zusammensetzung des Gliadins des Weizenmehles. *Z. physiol. Chem.*, 1905, **44**, 276-283.
17. Abderhalden (E.) u. Schittenhelm (A.). — Die Abbauprodukte des Elastins. *Z. physiol. Chem.*, 1904, **41**, 293-298.

18. Abderhalden (E.) u. Schmidt (H.). — Einige Beobachtungen und Versuche mit Triketohydrindenhydrat. *Z. physiol. Chem.*, 1913, **85**, 143.
19. Abderhalden (E.) u. Schmidt (H.). — Ueber die Verwendung von Triketohydrindenhydrat zum Nachweis von Eiweissstoffen und deren Abbaustufen. *Z. physiol. Chem.*, 1911, **72**, 37-43.
20. Abderhalden (E.) et Teruuchi (Y.). — Die Zusammensetzung von aus Kiefernsamen dargstellten Eiweiss. *Z. physiol. Chem.*, 1905, **45**, 473-478.
21. Abderhalden (E.) u. Voitinovici (A.). — Hydrolyse des Keratins aus Horn und aus Wolle. *Z. physiol. Chem.*, 1907, **52**, 348-367.
22. Abderhalden (E.) u. Voitinovici (A.). — Weitere Beiträge zur Kenntniss der Zusammensetzung der Proteine. *Z. physiol. Chem.*, 1908, **52**, 368-374.
23. Abderhalden (E.) u. Wells (H. G.). — Die Monoaminosäuren des Keratins aus Pferdehaaren. *Z. physiol. Chem.*, 1905, **46**, 31-39.
24. Anson (M. L.) et Mirsky (A. E.). — Protein coagulation and its reversal. The preparation of insoluble globin, soluble globin and heme. *J. gen. Physiol.*, 1930, **13**, 469-476.
25. Anson (M. L.) and Mirsky (A. E.). — Protein coagulation and its reversal. Globin. *J. gen. Physiol.*, 1931, **14**, 605-609.
26. Astbury (W. T.). — In *Cold Spring Harbor* 1934, **2**, 15, cité par Bergmann (M.) in *J. biol. Chem.*, 1935, **110**, 471-480.
27. Astbury (W. T.) and Woods (H. J.). — X. Ray studies of the structure of Hair, Wool, and related Fibres. *Trans. Roy. Soc. London*, 1933, **232** A, 333-394.
28. Barnett (H. M.). — Studies on leucine and dileucine hydrochloride and a new method for the isolation of leucine. *J. biol. Chem.*, 1933, **100**, 543-550.
29. Beach (E. F.), Bernstein (S. S.), Hummel (F. G.), Williams (H. H.) and Macy (I. G.). — Total sulfur, cystine and methionine content of blood globines of five mammalian species. *J. biol. Chem.*, 1939, **130**, 115-119.
30. Bergmann (Max). — Complex salts of amino acids and peptides : II. Determination of l-proline with the aid of rhodanilic acid. The structure of gelatin. *J. biol. Chem.*, 1935, **110**, 471-479.
31. Bergmann (Max) and Niemann (Carl). — On blood fibrin. A contribution to the problem of protein structure. *J. biol. Chem.*, 1936, **115**, 77-85.
32. Bergmann (Max) and Niemann (Carl). — On the structure of proteins : cattle hemoglobin, egg albumin, cattle fibrin, and gelatin. *J. biol. Chem.*, 1937, **118**, 301-314.
33. Bergmann (M.) and Niemann (C.). — On proteolytic enzymes. — The general nature of the enzymatic degradation of proteins. *J. biol. Chem.*, 1937, **118**, 781-788.
34. Birkofer (L.) u. Taurins (A.). — Quantitative Bestimmung der schwefelhaltigen aminosäuren in verschiedenen globinen. *Z. physiol Chem.*, 1940, **265**, 94-101.
35. Braconnot (H.). — Sur la conversion des matières animales en nouvelles substances par les moyen de l'acide sulfurique. *Ann. Chim. et Phys.*, 1820, (2), **13**, 119.

36. Braconnot (H.). — Recherches sur la fermentation du fromage, et sur l'oxyde caséeux et l'acide caséique. *Ann. Chim. et Phys.*, 1827, (2), **33**, 159-175.
37. Brazier (M. A. B.). — A new method for the separation of the products of protein hydrolysis. *Biochem. J.*, 1930, **24**, (2), 1188-1198.
38. Buchtala (H.). — Ueber das Schildpatt von *Chelone imbricata*. *Z. physiol. Chem.*, 1911, **74**, 212-220.
39. Buchtala (H.). — Ueber das Keratin der Elefanten-Epidermis. *Z. physiol. Chem.*, 1912, **78**, 55-61.
40. Buchtala (H.). — Ueber das Keratin der weissen Menschenhaare. *Z. physiol. Chem.*, 1913, **85**, 245-249.
41. Buchtala (H.). —Ueber das Keratin von Schlangenhäuten, *Z. physiol. Chem.*, 1913, **85**, 335-340.
42. Cahours (A.). — Sur l'identité de l'aposépédine et de la leucine, et sur la véritable constitution de ces produits. *C. R. Ac. Sc.*, 1848, **27**, 265-268.
43. Calvery (O.) et Schock (E.). — Crystalline eggalbumin. — III. Fractionation of peptic hydrolysis products by dialysis. *J. biol. Chem.*, 1936, **113**, 15.
44. Campbell (J. A.) and Poulton (P.). — The relation of oxyhaemoglobin to the carbon dioxide in the blood. *J. Physiol.*, 1920, **54**, 152.
45. Cohn (R.). — Zur Kenntniss des bei der Pancreasverdauung entstehenden Leucins. *Ber. dtsch. Chem. Ges.*, 1894, **27**, 2727-2732.
46. Cohn (R.). — Ueber eine quantitative Eiweissspaltung durch Salzsäure. *Z. physiol Chem.*, 1898, **26**, 395-410.
47. Dakin (H. D.). — Amino-acids of gelatin, *J. biol. Chem.*, 1920, **44**, 499-529.
48. Desnuelle (P.). — Sur le dosage colorimétrique de l'alanine et de la somme sérine + acide aspartique dans les protéines. Application à la protéine du ferment jaune. *Enzymologia*, 1938-1939, **5**, 37-43.
49. Dhéré (Ch.). — Sur la diversité des hémocyanines suivant leur origine zoologique. *C. R. Acad. Sc.*, 1913, **157**, 309.
50. Dumazert (C.). — Sur la technique du microdosage de l'acide lactique. *Bull. Soc. Chim. biol.* (*Trav.*), 1943, **25**, 1111-1112.
51. Dumazert (C.) et Marcelet (Y.). — Sur un nouveau catalyseur de minéralisation en vue du dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 201-211.
52. Emmerling (O.). — Ueber die Eiweissspaltung durch Papayotin. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, 1902, **35**, 695-700.
53. Engeland (R.). — Ueber Hydrolyse von Casein und den Nachweiss der dabei entstandenen Monoaminosäuren. *Ber dtsch. chem. Ges.*, 1909, **42**, 2962-2969.
54. Erlenmeyer et Schoeffer (A.). — Leucine : Proportion produite dans la décomposition des matières albuminoïdes. *Répertoire de Chimie pure*, 1861, P. III, 32.
55. Etard (A.). — Du dédoublement des albuminoïdes ou protoplasmides. *C. R.*, **132**, 1184.
56. Fabinyi (R.). — Darstellung von Farbstoffen aus Salicylaldehyd und Kettonverbindungen. *Chem. Centralbl.*, 1900, **2**, 301-302.
57. Felix (K.). — Ueber den Aufbau des Histons der Thymusdrüse. *Z. physiol. Chem.*, 1925, **146**, 103-121.

58. Fischer (E.). — Spaltung racemischer Aminosäuren in die optisch activen Komponenten. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, 1900, **33**, 2370-2393.
59. Fischer (E.). — Ueber die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure. *Z. physiol. Chem.*, 1901, **33**, 151-176.
60. Fischer (E.). — Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine. — *Ber. dtsch. chem. Ges.*, 1906, **39**, 530-610.
61. Fischer (E.). — Spaltung der α-aminoisovaleriansäure in die optisch activen Componenten. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, 1906, **39**, 2320-2328.
62. Fischer (E.) u. Abderhalden (E.). — Hydrolyse des Oxyhämoglobins durch Salzsäure. *Z. physiol. Chem.*, 1902, **36**, 268-276.
63. Fischer (E.) u. Dörpinghaus (Th.). — Hydrolyse des Horns. *Z. physiol. Chem.*, 1902, **36**, 462-477.
64. Fischer (E.), Levene (P. A.) u. Aders (R. H.). — Ueber die hydrolyse des Leims. *Z. physiol. Chem.*, 1902, **35**, 70-79.
65. Fischer (E.) et Skita (A.). — Ueber das Fibroïn der Seide. *Z. physiol. Chem.*, 1901, **33**, 177-192.
66. Fischer (H.). — On trouvera un exposé d'ensemble, en langue française, des recherches de Fischer dans : A. Kirrmann. La synthèse des porphyrines. *Bull. Soc. Chim.*, 1930, **47**, 913-932.
67. Foreman (F. W.). — Note on protein hydrolysis. *Proc. Cambridge Philosoph. Soc.*, 1911, **16**, 87-88.
68. Frankel (M. E.). — A comparative study of the behaviour of purified proteins towards proteolytic enzymes. *J. biol Chem.*, 1916, **26**, 31.
69. Frankel (S.), Gallia (H.), Liebster (A.), Rosen (S.). — Ueber die Produkte prolongierter tryptischen Verdauung des Caseins. *Biochem. Z.* 1924, **145**, 225-241.
70. Fromageot (C.) et Heitz (P.). — Méthode de dosage spécifique de la valine et de la leucine dans un mélange d'acides aminés quelconques. *Enzymologia*, 1939, **6**, 258-270.
71. Fromageot (C.) et Mourgue (M.). — Dosage de la valine et de la leucine dans les matières protéiques. *Enzymologia*, 1941, **9**, 329-336.
72. Gersdorff (C.) and Jones (D. B.). — Studies on digestibility of proteins in vitro. Rate of liberation of cystine on hydrolysis of caséin. *J. biol. Chem.*, 1933, **101**, 657-667.
73. Glass (J.). — Change in the isoelectric point of the haemoglobin and in the chlorine distribution in the blood in exophtalmic goiter. *Z. Klin. Med.*, 1931, **116**, 487-509.
74. Gorup-Besanez (E. V.). — Ueber die chemischen Bestandheile einiger Drüsensäfte. *Ann. der chem. u. Pharm.*, 1856, **98**, 1-43.
75. Gowland Hopkins (F.) u. Horace Savory. — *J. Physiol.* 1911, **42**, 189-250, cités par Alderhalden (E.) in : *Bioch. Handl.* 1911, IV Band, 533.
76. Harrington (C. R.) et Salter (W.). — The isolation of *l*-thyroxine from the thyroïd gland by the action of proteolytic enzymes. *Biochem. J.*, 1930, **24**, 456.
77. Haurowitz (F.). — Ueber pathologisch und physiologisch auftredende Formen des Hämoglobins und seiner Derivate. *Mediz. Klinik.*, 1929, N° 49/50.

78. Haurowitz (F.). — Zur Chemie des Blutfarbstoffes. X. Ueber die Spezifität der Hämoglobine und die v. Krugerschen Reaktion. *Z. physiol. Chem.*, 1929, **183**, 78-87.
79. Heitz (P.). — Nouvelles méthodes de dosage spécifique de quelques acides aminés. *Thèse Doct. Sci.*, Bosc et Riou, impr., Lyon 1939.
80. Henze (M.). — Zur Kenntniss des Hämocyanins. *Z. physiol. Chem.*, 1905, **43**, 290-298.
81. Hernler (F.) u. Philippi (E.). — Die elementare Zusammensetzung des kristallisierten Oxyhämozyanins von Helix pomatia. *Z. physiol. Chem.*, 1930, **191**, 23-27.
82. Hernler (F.) und Philippi (E.). — Die elementare Zusammensetzung verschiedener Hämozyanine. *Z. physiol. Chem.*, 1933, **216**, 110-119.
83. Hopkins (G.) and Savory (H.). — *J. Physiol.*, 1911, **42**, 189-250, cités par : Abderhalden (E.). in : *Bioch. Handl.*, 1915, **9**, 101.
84. Jones (D. B.) and Johns (C. O.). — Determination of the monoamino acids in the hydrolytic cleavage products of lactalbumin. *J. biol. Chem.*, 1921, **48**, 347-360.
85. Jordan Lloyd (D.) and Agnes Shore. — Chemistry of the proteins. London, 1938, 1 vol., 530 p.
86. Kögl (F.), Erxleben (H.) und Herken (H.). — Zur Stereochemie der Proteine von Myomen und anderen Geschwülsten. 3. Mitteilung über die chemie der Tumoren. *Z. physiol. Chem.*, 1939, **261**, 154-171.
87. Kossel (A.). — Zur Kenntniss des Salmins. *Z. physiol. Chem.*, 1904, **40**, 311.
88. Kossel (A.) u. Dakin (H. D.). — Ueber Salmin und Clupein. *Z. physiol. Chem.*, 1904, **41**, 407-415.
89. Kossel (A.) u. Kutscher (F.). — Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper. *Z. physiol. Chem.*, 1900-1901, **31**, 165-215.
90. Kutscher (F.). — Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskorper. *Z. physiol. Chem.*, 1903, **38**, 113-134.
91. Kutscher (F.) u. Lohmann (K.). — Zur Kenntniss der Papayotinverdauung. *Z. physiol. Chem.*, 1905, **46**, 383-386.
92. Kutscher (Fr.) et Seemann (J.). — Zur Kenntniss der Verdauungsvorgange im Dünndarm. *Z. physiol. Chem.*, **34**, 528-543.
93. Langstein (L.). — *Hofmeister's Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, **1**, page 507, cité in : *Bull. Soc. chimique*, 1902, **28**, 767.
94. Langstein (L.). — Hydrolyse des Zeins durch Salzsäure. *Z. physiol. Chem.*, 1902-1903, **37**, 508.
95. Laurent (A.), Gerhardt (C.). — Sur la composition de l'aposépédine ou leucine (oxyde caséique de Proust). *Annales de Chimie et de Physique*, 1848, **24**, (3), 321-326.
96. Levene (P. A.) u. Beatty (W. A.). — Analyse der Spaltungsprodukte der Gelatine. *Z. physiol. Chem.*, 1906, **49**, 252-261.
97. Levene (P. A.) u. Beatty (W. A.). — Ueber die Analyse der Spaltungsprodukte des Eialbumins. *Biochem. Z.*, 1907, **4**, 305-311.
98. Levene (P. A.) u. van Slyke (D. D.). — Hydrolyse von Wittepepton. *Biochem. Z.*, 1908, **13**, 440-457.
99. Levene (P. A.) and van Slyke (D. D.). — The leucine fraction in Casein and Edestin. *J. biol. Chem.*, 1909, **6**, 419-430.
100. Lieben (F.) u. Lieber (H.). — Ueber die Abspaltung von Arginin aus dem Eiweissverband durch Fermente. *Biochem. Z.*, 1934, **275**, 38-48.

101. Linderström-Lang. — Neuere Untersuchungen über die Anwendung von Enzymen zur Konstitutionsermittlung der Proteine. *Ergeb. d. Physiol.*, 1933, **35**, 415-468.
102. Lubavin (N.). — Untersuchungen von F. Hoppe-Seyler, 1871, **4**, 463-485. Cité par Abderhalden (E.) in : *Bioch. Handl.*, 1911, IV, 549.
103. Meisenheimer (J.). — Die stickstoffhaltigen Bestandheile der Hefe. *Z. physiol. Chem.*, 1919, **104**, 229-284.
104. Michaelis (L.) und Davidsohn (H.). — Ueber Kataphorese des Oxyhämoglobins. *Biochem. Z.*, 1912, **41**, 102.
105. Michel (R.). — Recherches sur la biochimie de la phénylalanine. *Thèse Doct. Pharm. Etat*, Marseille, 1 vol., Declume ed., Lons-le-Saunier.
106. Miller (L.) et Calvery (O.). — Enzymatic hydrolysis of lactalbumin. *J. biol. Chem.*, 1936, **116**, 393-408.
107. Moreigne (H.). — Présence de la leucine et de la tyrosine dans une urine de cystinurique. *J. Pharm. Chim.*, 1898, **8**, 484-487.
108. Morel (A.). — *Précis de technique chimique*, 1909, page 547, 1 vol., Coll. Testut.
109. Morel (A.) et Hugounenq (L.). — Formation d'acides aminés par hydrolyse de la pepsine. *Bull. Soc. chim. Paris*, 1908, **3**, 885.
110. Mörner (K. A. H.). — Zur Kenntniss der Bindung des Schwefels in den Proteinstoffen. *Z. physiol. Chem.*, 1901, **34**, 207-337.
111. Mourgue (M.) et Roger (M.). — Fractionnement des acides aminés par l'acide phosphotungstique et dosage des diacides monoaminés. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 1110-1111.
112. Mulder (G. J.). — Ueber den Leimzucker und das Leucin. *J. prakt. Chem.*, 1839, **16**, 290-297.
113. Mulder (G. J.). — Ueber die Leucinsalpetersäure. *J. prakt. Chem.*, 1839, **17**, 57-58.
114. Nicloux (M.). — L'oxyde de carbone et l'intoxication oxycarbonique. 1 vol., 245 p., 1925, Paris, Masson et Cie, éd.
115. Northrop. — *J. gen. Physiol.*, 1930, **13**, 739-767, et 1931, **14**, 713 ; cité par Jordan Lloyd, **85**, pp. 221-248.
116. Osborne (Th. B.). — The vegetable proteins. *Monographs on Biochemistry*, 1924, 1 vol., Longmans, Green and C°, London.
117. Osborne (Th.) u. Clapp (S. H.). — The chemistry of the protein bodies of the wheat kernel. III. Hydrolysis of the Wheat protein. *Amer. J. Physiol.*, 1906, **17**, 231-265.
118. Osborne (Th.) and Clapp (S. H.). — *Amer. J. Physiol.*, 1907, **19**, 468-474. Cités par Abderhalden (E.) in : *Bioch. Handl.*, 1911, IV Band, 533.
119. Osborne (Th.) and Clapp (S. H.). — Hydrolysis of the Proteins of Maize. *Amer. J. Physiol.*, 1907, **20**, 477-493.
120. Osborne (Th.) and Clapp (S. H.). — *Amer. J. Physiol.*, 1908, **20**, 477-493, cités par Abderhalden (E.) in : *Bioch. Handl.*, 1911, IV Band, 546.
121. Osborne (Th. B.) and Guest (H. H.). — Analysis of the Products of Hydrolysis of wheat gliadin. *J. biol. Chem.*, 1911, **9**, 425-438.
122. Osborne (Th.) and Jones. — Some modification of the method in use for determinig the quantity of monoamino acids yielded by proteins when hydrolyzed with acids. *Amer. J. Physiol.*, 1910, **26**, 212-228.

123. Osborne (T. B.), Jones (B.) and Leavenworth (C. S.). — Hydrolysis of crystallized albumins from hen's egg. *Amer. J. Physiol.*, 1909, **24**, 252-262.
124. Osborne (Th.) and Liddle. — Notes on the analysis of edestin and zein. *Amer. J. Physiol.*, 1910, **26**, 295.
125. Pirie (N. W.). — The oxydation of sulphydryl compounds by hydrogen peroxyde. I. Catalysis of oxydation of cysteine and glutathione by iron and copper. *Biochem. J.*, 1931, **25**, 1565-1579.
126. Plimmer (R. A. H.). — The chemical constitution of proteins. Part I. Analysis. In coll. *Monographs on Biochemistry*. 1 vol., 1917, 174 p., Longmans, Green and C°, London.
127. Pringsheim (H.). Studien über die Spaltung racemischer Aminosäuren durch Pilze. *Z. physiol Chem.*, 1910, **65**, 96-109.
128. Proscher (Fr.). — Ein Beitrag zur Erforschung der Konstitution des Eiweissmoleküls. *Z. physiol. Chem.*, 1899, **27**, 114-122.
129. Proust. — Recherches sur le principe qui assaisonne le fromage. *Ann. Chim. et Phys.*, 1819, **10**, (2), 29-49.
130. Ray Lankester (E.). — A contribution to the knowledge of haemoglobin. *Proc. Roy. Soc., B*, 1873, **21**, 71.
131. Reich-Herzberge (F.). — Ueber die Einwirkung von Trypsin auf Leim. *Z. physiol. Chem.*, 1901-1902, **34**, 119-121.
132. Reinbold (B. von). — Tierische Farbstoffe A. Blutfarbstoffe, 188-206, in : *Biochem. Handlexik.*, vol. VI, 390 p., J. Springer éd., Berlin, 1911.
133. Ritthausen. — Eiweisskörper der getreidearten usw. — Bonn. 1872, S. 125. Cité par Abderhalden (E.) in : *Bioch. Handl.*, 1911, IV Band, 546.
134. Roche (A.). — Inanition protéique. Réserves azotées et constitution des protéines musculaires. *Thèse Doct. Méd., Marseille*, 1933, 1 vol., Patissier, édit., Trévoux.
135. Roche (A.). — La plasticité des protéides et la spécificité de leurs caractères. 1 vol., 50 p., Hermann et Cie, éd., Paris 1935, in : *Actual., scient. et ind.*, série : Biophysique.
136. Roche (J.). — Essai sur la biochimie générale et comparée des pigments respiratoires. 1 vol., 170 p., 1936, Masson et Cie, éd.
137. Roche (J.), Derrien (Y.) et Moutte (M.). — Solubilité dans des solutions salines concentrées et caractères spécifiques des hémoglobines sanguines. I. *Bull. Soc. Chim. biol.* (*Trav.*)., 1941, **23**, 1114-1129.
138. Roche (J.) et Dubouloz (P.). — Sur la spécificité des globines dans les hémoglobines. *C. R. Soc. biol.*, 1933, **113**, 317.
139. Roche (J.) et Jean (G.). — Recherches sur la composition en acides aminés des pigments respiratoires des Invertébrés. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, 769-778.
140. Roche (J.) et Vieil (H.). — Préparation et poids moléculaire de la myoglobine (hémoglobine musculaire) de Cheval cristallisée. *C. R. Acad. Sc.*, 1940, **210**, 314.
141. Röhmann (F.). — Zur Kenntniss der bei der Trypsinverdauung aus dem Casein entstehenden Produkte. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, 1897, **30**, 1978-1981.
142. Rona (P.). — Praktikum der physiologischen Chemie. 1 vol., 764 p., Springer éd., Berlin, 1926 (Volume contenant la description de techniques d'enzymologie).

143. Rose (W.). — *Science*, 1937, **86**, 298, et *Physiol. Rev.*, 1938, **18**, 109. Cité par Jordan Lloyd, [**85**], p. 178-220.
144. Rose (W.)., Kemmerer (S.), Womack (M.), Mertz (E.), Gunther (K.), Mac Coy (R.), and Meyer (C.). — The present status of the aminoacids in Nutrition. *J. biol. Chem.*, 1936, **114**, xxxv.
145. Salaskin (S.). — Ueber die Bildung des Leucinimids bei der peptischen und tryptischen Verdauung des Oxyhamoglobins resp. des globins. *Z. physiol. Chem.*, 1901, **32**, 592-597.
146. Schenck (E. G.). — Untersuchungen über das Globin bei Tieren, gesunden und kranken Menschen. Ein Beitrag zur Kenntniss der dynamischen Konstitution des Hämoglobins. *Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak.*, 1930, **150**, 160-172.
147. Schmidt (Carl. A.). — The chemistry of the amino-acids and proteins. 1 vol., 1938, 1030 pages, Baillière, Tindall et Cox Ed.
148. Schoenheimer (R.), Ratner (S.) and Rittenberg (D.). — Studies in protein metabolism. The metabolic activity of body proteins investigated with *l*(-)leucine containing two isotopes. *J. biol. Chem.*, 1939, **130**, 703-732.
149. Schulze (E.). — Ueber einige stickstoffhaltige Bestandteile der Keimlinge von *Soja hispida*. *Z. physiol. Chem.*, 1888, **12**, 405-415.
150. Schulze (E.). — Ueber einige stickstoffhaltige Bestandteile der Keimlinge von *Vicia sativa*. *Z. physiol. Chem.*, 1893, **17**, 193-219.
151. Schulze (E.). — Ueber den Umsatz der Eiweisstoffe in der lebenden Pflanze. *Z. physiol. Chem.*, 1900, **30**, 241-312.
152. Schulze (E.). — Beiträge zur Kenntniss einiger aus Pflanzen dargestellten Aminosäuren. *Z. physiol. Chem.*, 1902, **35**, 299-314.
153. Schulze (E.) u. Bosshard (E.). — Ueber das optische Verhalten einiger Amidosäuren. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, 1884, **17**, 1610.
154. Schulze (E.) et Likiernik (A.). — Ueber die Konstitution des Leucins. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, 1891, **24**, 669-674.
155. Schwanert (M.). — Recherches sur la leucine. *Annales de Chimie et de Physique*, 1858, **52**, 501-502.
156. Shorey. — *Journ. Amer. chem. Soc.*, 1898, **20**, 133, cité par Abderhalden (E.) in : *Biochemisches Handlexikon*, 1911, IV Band, 544.
157. Sjollema (B.) u. Rinkes (J. J.). — Die Hydrolyse des Kartoffeleiweisses. *Z. physiol. Chem.*, 1911-1912, **76**, 369-384.
158. Skraup (Z.) et Biehler (A.). — Ueber die Zusammensetzung der Gelatine. *Monatsch.*, 1909, **30**, 467-480.
159. Slyke (D. D. van). — Cité d'après Plimmer (A. H.) : The Chemical constitution of proteins. I. In coll., *Monogr. on Biochem.*, 1917, 1 vol., 174 p., in-8°, London, Longmans, Green and C°.
160. Straub (H.) und Meyer (K.). — Der isoelektrische Punkt roter Blutkörperchen verschiedener Säugetiere. *Biochem. Z.*, 1923, **134**, 606-619.
161. Suwa Akikazu. — Cocons aus der japanischem Seide Haruko. *Z. physiol. Chem.*, 1910, **68**, 275-276.
162. Svedberg (T.). — Sedimentation constants, molecular weights and isoelectric points of the respiratory proteins. *J. biol. Chem.*, 1933, **103**, 311-325.

163. Svedberg (T.) and Eriksson (I. B.). — The molecular weight of erythrocruorin. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1933, **55**, 2834-2941.
164. Svedberg (T.) and Eriksson-Quensel (I. B.). — The molecular weight of erythrocruorin. II. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1934, **56**, 1700-1705.
165. Thomas (P.). — Sur une réaction colorée de l'ammoniaque. *Bull. Soc. Chim.*, 1912, **11**, 798.
166. Timar (E.). — Ueber den Schwefelgehalt das Hämoglobins im Blute rassenreiner Hunde und einiger seltener untersuchten Tierarten. *Biochem. Z.*, 1928, **202**, 365-379.
167. Vickery (H. B.). — The rate of hydolysis of wheat gliadin. *J. biol. Chem.*, 1922, **53**, 495-511.
168. Vickery (H. B.) and Laevenworth (C. S.). — The basic amino acids of horse haemoglobin. *J. biol. Chem.*, 1928, **79**, 377-388.
169. Vlès (F.). — Notes sur les propriétés spectrales de l'hémoglobine des Annélides. *Arch. Phys. biol.*, 1923, **2**, fasc. 6, 1-24.
170. Wrinch (D. M.). — On the pattern of proteins. *Proc. Roy. Soc. London*, 1937, **160** A, 59-86.
171. Wurtz (A. D.). — Dictionnaire de chimie pure et appliquée. Lib. Hachette et Cie, éd., Paris.
172. Zittel (K. A.). — Traité de Paléontologie. R. Oldenburg, éd., Munich, 1887.

TABLE DES MATIÈRES.

AVANT-PROPOS 5

INTRODUCTION 7

EXPOSÉ DES TRAVAUX ANTÉRIEURS ET OBJET DU TRAVAIL.

Constitution et propriétés de la leucine et de la valine.. 8

A. Leucine 8

a) Etat naturel 8

b) Constitution 9

c) Propriétés physiques 9

d) Propriétés chimiques 10

B. Valine 11

a) Etat naturel 11

b) Constitution 11

c) Propriétés physiques 12

d) Propriétés chimiques 12

Dosage de la leucine et de la valine dans les protéines. 12

I. Méthodes :

Méthode de E. FISCHER..... 13

Méthode de LEVENE, BEATTY et VAN SLYKE.... 15

Méthode de BRAZIER..... 16

Méthode de DAKIN 17

Méthode de BARNETT..... 17

II. Résultats 19

La leucine et la valine dans les molécules protéiques 22

Objet du travail 24

RECHERCHES PERSONNELLES.

CHAPITRE I.

Dosage de la leucine et de la valine dans les protéines.. 27

A. Principe de la méthode 27

B. Description de la méthode 28

C. Contrôle de la méthode 38

D. Dosage de la valine et de la leucine dans une protéine (édestine) 39

E. Cas des protéines très riches en leucine..... 40

Conclusion du chapitre I..... 42

CHAPITRE II.

Teneur en leucine, en valine et en alanine des protéines et des pigments respiratoires 44

I. Teneur en leucine, en valine et en alanine des pigments respiratoires. Spécificité des chromoprotéides 48

Matériel d'étude et techniques 48

Résultats expérimentaux 50

Discussion des résultats..... 52

A. Spécificité et composition des hémoglobines sanguines et musculaires..... 52

B. Spécificité et composition des pigments respiratoires d'Invertébrés (hémocyanines et érythrocruorines) 55

C. Constitution des protéines et teneur des chromoprotéides respiratoires en leucine, en valine et en alanine..... 57

II. Teneur en leucine et en valine de divers euprotéides et d'un phosphoprotéide 62

Matériel d'étude 62

Résultats expérimentaux 64

Discussion des résultats 65

Conclusions du Chapitre II 67

CHAPITRE III.

Hydrolyse chimique ou enzymatique des protéines, réactivité des groupements isopropyliques de la leucine et de la valine et libération progressive de ces acides aminés.... 69

A. Rendement en acétone des groupements isopropyliques de la leucine et de la valine engagées dans des peptides 70

B. Hydrolyse acide ou alcaline de diverses protéines 73

Matériel d'étude et techniques..... 73

Résultats expérimentaux 74

Examen d'ensemble des résultats..... 80

Discussion générale des résultats..... 86

I. Evolution générale de l'hydrolyse acide ou alcaline et mise en liberté de la leucine et de la valine 86
II. Diversité des hydrolyses acide et alcaline 87
III. Libération de la leucine et de la valine au cours de l'hydrolyse et constitution des protéines 87

C. Hydrolyse enzymatique de diverses protéines.. 89
Matériel d'étude et technique..... 90
Résultats expérimentaux 92
A. Hydrolyse pancréatique, papaïnique et pepsique de diverses protéines 92
B. Fractionnement par l'acide phosphotungstique des produits de l'hydrolyse papaïnique et pepsique de la caséine..... 98

Examen d'ensemble des résultats 98
I. Action de la pancréatine sur les protéines 102
II. Action de la papaïne..... 103
III. Action de la pepsine..... 104
IV. Fractionnement phosphotungstique des produits des hydrolyses papaïnique ou pepsique 106

Discussion générale des résultats..... 106
I. Evolution générale de l'hydrolyse enzymatique et diversité d'action de chaque enzyme 107
II. Libération de la leucine et de la valine au cours des hydrolyses enzymatique et chimique et constitution générale des protéines 108
III. Diversité de structure des différentes protéines et protéolyse enzymatique..... 111

Conclusions du Chapitre III..... 112

Conclusions générales 115

Bibliographie 121

SECONDE THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

1. — Les métamorphoses des Amphibiens en relation avec les glandes endocrines.

2. — Le mécanisme biochimique général de l'ossification.

M. Declume, Imp., Lons-le-Saunier (31.2160)
Mars 1944 — Dépôt légal 1er trimestre 1944 — N° 3553 (473-44-200).